



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Pauline BLANQUET

le vendredi 16 octobre 2015

Titre :

Étude de protéines de *Sinorhizobium meliloti* impliquées dans le contrôle du
niveau de NO : modulation de la sénescence des nodules de *Medicago*
truncatula

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Agrosystèmes, écosystèmes et environnement

Unité de recherche :

LIPM

Directeur/trice(s) de Thèse :

Claude BRUAND

Eliane MEILHOC

Jury :

Matthieu ARLAT (président)

Éric GIRAUD (rapporteur)

Sylvain JEANDROZ (rapporteur)

Nicolas PAULY (rapporteur)

Maria DELGADO (examinatrice)

RESUME

Auteur : Pauline Blanquet

Titre : Etude de protéines de *Sinorhizobium meliloti* impliquées dans le contrôle du niveau de NO : modulation de la sénescence des nodules de *Medicago truncatula*.

Directeurs de thèse : Claude Bruand et Eliane Meilhoc

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule gazeuse impliquée dans de nombreux processus biologiques chez les plantes, de la germination de la graine à la mise en place de réponses à des stress abiotiques et biotiques. Dans les interactions plante/ pathogène, le NO fait partie de l'arsenal de défenses de l'hôte. En réponse, les pathogènes ont développé des mécanismes pour contrer les effets du NO. Dans la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, du NO a été détecté durant toutes les phases de l'interaction. L'équipe avait précédemment montré que la réponse de *S. meliloti* au NO est nécessaire au maintien de la symbiose puisque des nodules formés par une souche mutée dans le gène *hmp* (le gène *hmp* est induit par le NO et code pour une protéine qui dégrade le NO) sénescent prématurément. Au cours de cette thèse, nous avons étudié 3 nouveaux gènes de *S. meliloti* induits par le NO : *nnrS1*, *nnrS2* et *norB*. *nnrS1* et *nnrS2* codent pour deux protéines de fonction inconnue et *norB* code pour une NO réductase qui dégrade le NO. Nous avons montré que ces 3 protéines participent d'une part à la résistance des bactéries au NO en culture et d'autre part, au maintien de l'interaction symbiotique. Par ailleurs, nous avons montré que ces 3 protéines sont impliquées directement ou indirectement dans la dégradation du NO et des résultats préliminaires suggèrent que NnrS1 présente une activité NO réductase. De plus, nous avons montré que NnrS1 et Hmp n'agissent pas seulement sur les bactéries mais aussi sur les protéines végétales. Il était connu que dans les nodules de *M. truncatula*, la glutamine synthétase (GS) végétale, une enzyme clé de la symbiose, est inhibée par tyrosine nitration, une modification post-traductionnelle dépendante du NO. Nous avons montré que NnrS1 et Hmp, en modulant le niveau de NO dans les nodules, contrôlent l'activité de la GS. Enfin des expériences préliminaires montrent que d'autres protéines (bactériennes et/ou végétales) pourraient être tyrosine nitrées.

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borderouge, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex.

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule involved in a large range of biological processes in plants from the seed germination to abiotic and biotic stress responses. In plant-pathogen interactions, NO is part of the defense systems. In response, pathogens have developed mechanisms in order to counteract the NO effects. In the nitrogen fixing symbiosis between the model leguminous plant *Medicago truncatula* and the bacterium *Sinorhizobium meliloti*, NO has been detected at all stages of the symbiosis. The team had previously shown that the *S. meliloti* response to NO is necessary to maintain the symbiotic interaction since nodules elicited by a strain mutated in the *hmp* gene (*hmp* is induced by NO and codes for a flavohemoglobine that degrades NO) senesce prematurely. During this thesis, we have studied 3 new genes of *S. meliloti* whose expression is induced by NO: *nnrS1*, *nnrS2* and *norB*. *nnrS1* and *nnrS2* encode two proteins of unknown function and *norB* codes for a NO reductase which degrades NO. We have shown that these 3 proteins participate on one hand in bacterial NO resistance in culture and on the other hand in maintaining the symbiotic interaction. Furthermore, we have shown that these 3 proteins are involved, directly or indirectly, in NO degradation and preliminary results suggest that NnrS1 displays a NO reductase activity. Moreover, we have shown that NnrS1 and Hmp are not only dedicated to bacterium but also play a role on plant proteins. It was already known that, in *M. truncatula* nodules, the plant glutamine synthétase (GS), a key enzyme of the symbiosis is inhibited by tyrosine nitration, a NO post-translational modification. We have shown that NnrS1 and Hmp, by modulating NO levels in nodules, control the GS activity. Finally, preliminary experiments suggest that other proteins (of bacterial and/or plant origin), could be tyrosine nitrated.

MFRL...

Aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse et tout particulièrement à mes 3 rapporteurs, Sylvain Jeandroz, Fric Giraud et Nicolas Pauly.

A nos collaborateurs Carole Pichereaux de la plateforme protéomique de Toulouse, Helena Carvalho de l'IBMC de Porto et Dominique Serça et Claire Delon du laboratoire d'aérodynamique de Toulouse. Vos conseils et expertises m'ont permis d'avancer dans mes travaux de recherche.

A tous les membres du LIPM que j'ai côtoyé de près ou de loin pendant ces 3 années et demi. Au service commun qui nous facilite grandement la tâche.

A Claude et Eliane pour m'avoir encadrée pendant mon stage de master 2 et au cours de ces 3 années de thèse. Je suis ravie d'avoir travaillé en votre compagnie car en plus de vos connaissances scientifiques et de vos conseils avisés vous avez la joie de vivre et vous êtes de sacrés déconneurs. Je suis arrivée un peu innocente et insouciante et vous m'avez fait grandir. MFRL !!!

A Laurent à qui je dois beaucoup. Je t'ai souvent sollicité et à chaque fois tu as été là pour me conseiller et pour m'aider. Sans oublier tes gâteaux et tes cannelés qui m'ont marqué...j'en garde encore l'eau à la bouche...

A Pierrot !!! C'est à toi à qui je dois le plus... on a été comme tic et tac tout au long de la thèse. Tu m'as tellement aidé scientifiquement mais surtout qu'est ce qu'on a pu rire. J'avoue que je suis une gaffeuse et que sans cesse je dis des « boulettes » (involontaires je précise) et toi tu as été un très bon public. Conclusion j'ai passé une grande partie de ma thèse à rire...

A tous les autres membres de l'équipe EBR, Magalie et Anne-Claire les petites nouvelles et Frans. Votre gentillesse au quotidien est tellement agréable. Bon courage Anne-Claire pour la suite des manip...

A mes coloc de bureau Steph, Mag et Etienne et toutes les sympathiques âmes de passage qui ont contribué à rendre les moments passés au boulot très agréables. J'ai fait de très belles rencontres et lié des amitiés qui perdureront malgré la distance (bon l'Aveyron ce n'est pas si loin que ça...)

A tous les non-perm actuels et passés et notamment mes fidèles supporters, Aliçon pollison, Léa, Pierrot Bis, Plan Plan, Cyril, Claudia, Fanette, Maël et Brichon. Un grand merci !!! Que de bons moments partagés et de rires à la clé !!!

A mes amis d'enfance, de toujours... Camille, Mélanie, Lucie, Lisa, Lolo, Atlan, Flo, Marielle, Joto, Raph et Cecilia !!! Tous ces moments de partage, de complicité m'ont aidé, vous m'avez soutenu dans les moments difficiles...Merci aussi à toutes mes copines du foot, j'ai pu me défouler sur le terrain et partager des troisièmes mi-temps bien sympathiques.

À ma famille, ma sœur, mon papa et ma maman. Vous êtes mon pilier, vous avez été en moi et vous m'avez soutenu.

À mon chéri, qui m'a supporté et qui a écouté une petite thésarde en détresse. Merci pour ta patience !! Tu as toujours su trouver les mots pour me remotiver et me redonner le sourire.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| SOMMAIRE | 3 |
| TABLEAU DES ABREVIATIONS | 6 |
| INTRODUCTION | 8 |
| I) Le monoxyde d'azote (NO) chez les plantes | 8 |
| 1) Caractéristiques chimiques du NO | 8 |
| 2) Synthèse du NO | 9 |
| 3) Rôles du NO | 10 |
| 4) Modes d'action du NO | 12 |
| II) Les réponses des bactéries au NO | 18 |
| 1) Les systèmes senseurs bactériens du NO | 19 |
| 2) Les mécanismes de piégeage/dégradation du NO | 21 |
| 3) Les mécanismes de résistance au NO | 24 |
| III) Le NO dans les symbioses légumineuses/rhizobia | 26 |
| 1) La symbiose fixatrice d'azote <i>M. truncatula</i> / <i>S. meliloti</i> : notre modèle d'étude | 27 |
| 2) Du NO est détecté à toutes les étapes de la symbiose <i>Medicago</i> / <i>S. meliloti</i> | 31 |
| 3) La modulation du niveau de NO dans les nodules symbiotiques | 33 |
| 4) Rôles du NO dans les nodules symbiotiques et importance de la réponse bactérienne au NO pour le maintien de la symbiose | 36 |
| RESULTATS | 40 |
| I) <i>S. meliloti</i> code pour au moins 4 protéines impliquées dans le contrôle du niveau de NO | 40 |
| 1) NnrS1, NnrS2 et NorB participent à la résistance au NO en culture | 41 |
| 2) NnrS1 et NnrS2 participent directement ou indirectement à la dégradation du NO en culture | 42 |
| 3) NnrS1, NnrS2, Hmp et NorB agissent indépendamment en culture | 43 |
| 4) NnrS1 semble avoir une activité NO réductase | 44 |
| 5) NnrS1 et NnrS2 participent directement ou indirectement à la dégradation du NO dans les nodules symbiotiques | 46 |
| II) Les plantes inoculées avec les mutants <i>nnrS1</i>, <i>nnrS2</i> ou <i>norB</i> présentent une sénescence précoce des nodules | 48 |
| 1) Caractérisation macroscopique et microscopique de la sénescence des nodules formés par les mutants bactériens <i>nnrS1</i> , <i>nnrS2</i> et <i>norB</i> | 48 |
| 2) Les bactéries se différencient en bactéroïdes mais perdent leur viabilité dans les nodules formés par les mutants <i>nnrS1</i> , <i>hmp</i> et <i>norB</i> | 49 |
| 3) Les plantes inoculées avec chacun des mutants présentent une diminution de la fixation d'azote corrélée à une réduction du développement des parties aériennes | 50 |
| 4) La diminution de la quantité de NO en zone III du nodule suffit à retarder la sénescence | 51 |
| III) Etude de la tyrosine nitration de protéines bactériennes et végétales | 53 |
| 1) Les protéines bactériennes NnrS1 et Hmp régulent la tyrosine nitration et l'activité de la GS végétale dans les nodules | 54 |
| 2) Mise en évidence de nouvelles protéines bactériennes et végétales tyrosine nitrées | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 3) Vers l'identification par spectrométrie de masse des protéines bactériennes tyrosine nitrées | 57 |
| DISCUSSION | 60 |
| I) Fonction de NnrS1 et NnrS2 de <i>S. meliloti</i> | 60 |
| II) Les nodules formés par les mutants <i>nnrS1</i>, <i>nnrS2</i> et <i>norB</i> accumulent du NO et sénescence prématurément | 62 |
| III) Contribution respective de chacune des protéines dans le contrôle du niveau de NO dans les nodules | 66 |
| IV) Mode d'action du NO dans l'induction de la sénescence : étude de la tyrosine nitration de protéines végétales et bactériennes | 68 |
| MATERIELS ET METHODES | 72 |
| I) Souches et plasmides | 72 |
| 1) Culture des souches bactériennes | 72 |
| 2) Construction du mutant de délétion <i>nnrS2</i> | 72 |
| 3) Construction des souches surexprimant <i>nnrS1</i> et <i>hmp</i> | 73 |
| 4) Construction des souches contenant le biosenseur du NO | 73 |
| II) Test de sensibilité au NO | 76 |
| IV) Conditions de croissance des plantes | 77 |
| IV) Détection et quantification du NO | 77 |
| 1) Détection sur coupes de nodules | 77 |
| 2) Quantification du NO | 78 |
| V) Extraction d'ARN de nodules, reverse transcription et analyse d'expression du gène <i>hmp</i> | 79 |
| VI) Dosage du N₂O par chromatographie en phase gazeuse | 80 |
| VII) Dosage d'une activité NO réductase | 81 |
| VIII) Observation et mesure des paramètres biologiques liés à la sénescence des nodules | 81 |
| 1) Suivi de la sénescence des nodules | 81 |
| 2) Microscopie électronique et coloration au bleu de Toluidine | 81 |
| 3) Coloration avec la sonde « Live and Dead » | 82 |
| 4) Fixation de l'azote mesurée par le test de réduction de l'acétylène (ARA) | 82 |
| 5) Mesure du poids sec des parties aériennes des plantes | 82 |
| IX) Quantification de la tyrosine nitration et activité de la Glutamine Synthétase (GS) | 83 |
| 1) Extractions des protéines, SDS-PAGE et analyse par Western blot | 83 |
| 2) Quantification de la nitration de la GS par un test ELISA | 83 |
| 3) Détermination de l'activité de la GS | 84 |
| X) Tyrosine nitration de protéines bactériennes | 84 |
| 1) Profil de protéines tyrosine nitrées de nodules | 84 |
| 2) Profil de protéines tyrosine nitrées de cultures bactériennes | 84 |
| 3) Identification des protéines bactériennes tyrosine nitrées en culture | 86 |

| | |
|-------------------|-----------|
| ANNEXES | 88 |
| REFERENCES | 91 |

TABLEAU DES ABREVIATIONS

ABA : Acide abscissique

ARA : Acetylen Reduction Assay

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

cPTIO : 2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide

COX : cytochrome c oxidase

DAF-2 : 4,5-Diaminofluoresceine

DAF-2DA : 4,5 Diaminofluorescein diacetate

DAF-2T : Triazolofluoresceine

DEA NONOate : 1,1-Diéthyl-2-hydroxy-2-nitroso-hydrazine de sodium 2-(N,N-Diethylamino)-diazénolate 2-oxide

ETC : Electron Transporter Chain

GC : Guanylate cyclase

GOGAT : Glutamine-2-OxoGlutarate-Amino-Transférase

GS : Glutamine synthétase

GSH : Glutathion

GSNO : S-nitrosoglutathion

GSNOR : GSNO réductase

HR : Hypersensitive Response

Da: Dalton

Lb : Leghémoglobine

LbNO : Nitrosoleghémoglobine

LPS : Lipopolysaccharide

MV: Méthyl Viologen

NO : oxyde nitrique

NO₂⁻ : Nitrite

NO₃⁻ : Nitrate

N₂O: Oxyde nitreux

N₂: Diazote

Nir : Nitrite réductase

Nor : NO réductase

Nos : N₂O réductase

NOS : NO synthétase

NR/ Nap : Nitrate réductase

ONOO⁻ : Péroxynitrite

PCR : Polymerase Chain Reaction

pSymA : plasmide symbiotique A

pSymB : plasmide symbiotique B

RNS : Reactive Nitrogen Species

ROS : Reactive Oxygen Species

SNP : Nitroprussiate de sodium

SpNN : Spermine NONOate

INTRODUCTION

1) Le monoxyde d'azote (NO) chez les plantes

Le monoxyde d'azote ou NO a été découvert en 1772 dans l'air par un théologien et chimiste anglais Joseph Priestley. D'abord nommé « air nitreux », Joseph Priestley le décrit comme induisant une sensation de bien être couplée à des crises de rire. Depuis sa découverte, il a été démontré que le NO orchestre une pléthore de fonctions physiologiques et a reçu le titre de « molécule de l'année » en 1992 par le journal *Science*. D'abord très étudié et décrit chez les animaux pour être impliqué dans divers processus biologiques tels que la neurotransmission, la vasodilatation ou encore l'immunité, l'étude du NO dans les systèmes végétaux et microbiens a suscité un vif intérêt depuis ces dernières années. A ce jour, la littérature sur le NO est colossale. Ainsi, le mot clé « nitric oxide » sur le moteur de recherche PubMed renvoie à plus de 135 000 articles.

1) Caractéristiques chimiques du NO

Le NO qui est composé d'un atome d'azote et d'oxygène est une petite molécule gazeuse très réactive. Sa réactivité et son temps de demi-vie très court (1-5 s) sont dus à la présence d'un électron orbital non apparié lui conférant des propriétés oxydantes (Stamler *et al.*, 1992). En effet, pour être électroniquement plus stable, le NO interagit avec de nombreuses molécules de diverses natures telles que les lipides, l'ADN, les protéines et les espèces réactives de l'oxygène. Par exemple, les ions ferriques hémiques et non hémiques contenus dans les protéines sont des lieux privilégiés d'interaction avec le NO (Besson-Bard *et al.*, 2008b; Scheler *et al.*, 2013). Le NO est aussi bien connu pour interagir avec l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) conduisant à la formation du peroxynitrite ($ONOO^-$), une molécule très oxydante impliquée dans la tyrosine nitration des protéines (Besson-Bard *et al.*, 2008 ; Scheler *et al.*, 2013). Cependant, la réactivité et la durée de vie du NO peuvent être modulées en fonction de son environnement (pH, température, pouvoir redox...). En effet, par exemple, le pH acide de l'apoplasme stabilise les molécules de NO (Besson-Bard *et al.*, 2008).

Une autre caractéristique du NO est d'être une molécule hydrophobe. Cette hydrophobicité lui confère la possibilité de traverser les membranes biologiques et ainsi d'agir à distance. Un exemple illustrant bien cette propriété est la caractérisation du NO comme

neurotransmetteur gazeux (le seul existant) chez les mammifères (Paul and Ekambaram, 2011). Cependant, chez les animaux, la diffusion du NO serait facilitée par les aquaporines qui, outre leur aptitude à transporter l'eau, pourraient véhiculer le NO et d'autres gaz (Herrera and Garvin, 2011).

2) Synthèse du NO

Chez les animaux, la synthèse du NO est assurée par des NO synthétases (NOS) qui catalysent la transformation de la L-arginine en L-citrulline et NO. Chez les végétaux, bien qu'aucun homologue des NOS animales n'ait été trouvé, des études ont montré l'existence d'une activité NOS-like dans différents tissus végétaux et organelles (Corpas *et al.*, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008). En outre, des inhibiteurs des NOS de mammifères peuvent supprimer la synthèse de NO dans les plantes et dans des suspensions cellulaires en réponse à différents stimuli (Guo *et al.*, 2003; Mur *et al.*, 2005).

Récemment, une autre voie de synthèse du NO chez les plantes a été démontrée : les nitrates réductases (NR). Ces enzymes connues pour catalyser la réduction des nitrates (NO_3^-) en nitrites (NO_2^-), réduisent aussi les nitrites en NO via l'utilisation du cofacteur NADPH comme donneur d'électrons (Yamasaki and Sakihama, 2000). Cette voie de synthèse du NO participe à un grand nombre de processus biologiques notamment lors de la fermeture des stomates. En effet, la double mutation des gènes *nial1* et *nial2* codant pour les 2 isoformes des nitrate réductases chez *Arabidopsis thaliana*, conduit à un arrêt de la synthèse de NO en réponse à l'acide abscissique, provoquant ainsi un blocage de la fermeture des stomates (Gayatri *et al.*, 2013).

De plus, du NO serait synthétisé lors du catabolisme des polyamines par les polyamines oxydases. Les polyamines sont de petites molécules azotées issues notamment du catabolisme des acides aminés. Il a été montré que des plantules d'*A. thaliana* traitées avec des polyamines produisent du NO. Par ailleurs, un double mutant *nial1/nial2* est capable de produire du NO en présence de polyamines. De plus, un mutant de polyamine oxydase (diamine oxydase) synthétise moins de NO qu'une lignée sauvage en présence de polyamines (Tun *et al.*, 2006).

Enfin, du NO peut être généré de façon non enzymatique. Par exemple, une réduction spontanée des nitrites en NO a été caractérisée à pH acide dans l'apoplasme des cellules aleuroniques de la graine (Bethke *et al.*, 2004). Cette production de NO dans les couches supérieures de la graine pourrait avoir un rôle antimicrobien (Bethke *et al.*, 2004).

3) Rôles du NO

Le rôle du NO est très dépendant de sa concentration.

a) *Le NO en tant que molécule signal*

A faibles concentrations ($\leq \mu\text{M}$), le NO est décrit comme une molécule signal impliquée dans de nombreux processus biologiques chez les plantes, du développement aux réponses aux stress abiotiques (Yu *et al.*, 2014).

Le NO a par exemple été décrit comme un répresseur de la floraison chez *A. thaliana* (He *et al.*, 2004). En effet, le NO inhibe l'expression du gène codant pour le régulateur majeur de transition du méristème végétatif en méristème floral LFY. A l'inverse, le NO active l'expression du gène codant pour la protéine FLC, un inhibiteur de LFY (Simpson, 2005). En outre, le NO a un rôle inducteur de la germination. En effet, une application exogène de NO lève la dormance des graines d'*A. thaliana*. En revanche, un traitement avec un piègeur de NO inhibe la germination (Bethke *et al.*, 2007). Il a été proposé que le NO intervienne à la fois dans le catabolisme de l'acide abscissique, une phytohormone inhibant la levée de dormance des graines et dans la synthèse des gibbérellines, des phytohormones activatrices de la germination via les espèces réactives de l'oxygène (Arc *et al.*, 2013).

Le NO joue aussi un rôle crucial dans la réponse à différents stress abiotiques tels que les stress hydrique, salin, herbicide, chaud, UV... (Qiao and Fan, 2008). Un exemple bien décrit est le rôle activateur du NO dans la réponse au stress froid. En effet, suite à un stress froid, du NO est synthétisé et va agir à la fois sur la transcription des gènes de réponse à ce stress (gènes CBF) et sur la réorganisation lipidique de la membrane (Cantrel *et al.*, 2011).

Enfin, grâce à sa capacité de diffusion, le NO est aussi un signal mobile qui transite de cellule en cellule. En effet, le NO ferait partie de la résistance acquise systémique (SAR), une résistance généralisée à la plante entière via un mécanisme dépendant de l'acide salicylique suite à une infection localisée (Song and Goodman, 2001).

b) *Le NO en tant que molécule toxique*

A plus fortes concentrations ($\sim \text{mM}$), le rôle signal du NO laisse place à un rôle toxique. Comme cela a été dit précédemment, le NO a un fort pouvoir oxydant et peut engendrer des dommages sur plusieurs molécules vitales telles que l'ADN, les protéines ou encore les lipides. En effet, en 1991, Wink et ses collègues ont montré que le NO est capable d'entraîner

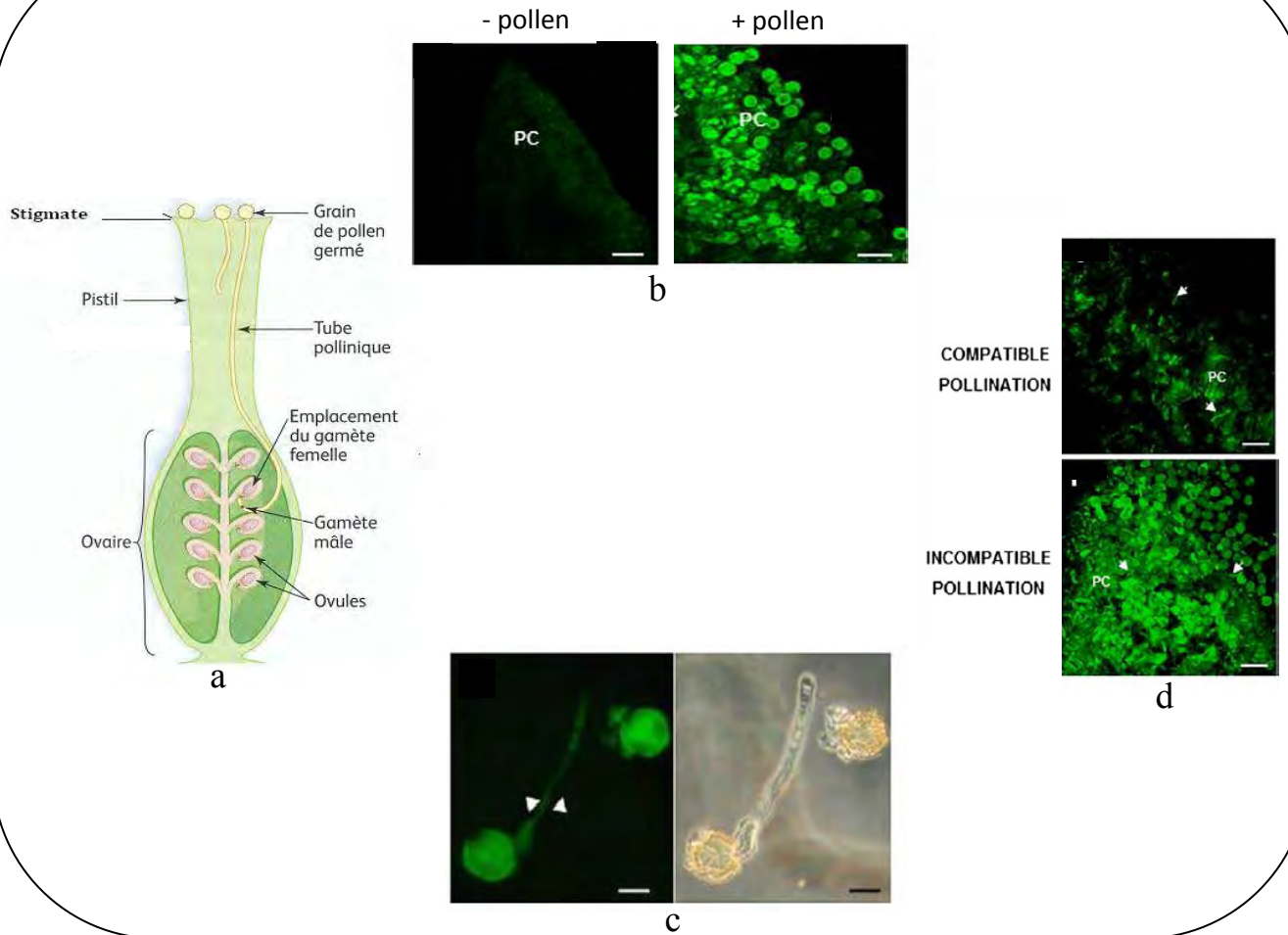


Figure 1: Détection du NO lors de l'incompatibilité pollinique.

a) schéma général de la reproduction chez les plantes b) détection du NO dans les cellules du stigmate en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO, la DAF-2DA en absence et présence de l'autopollen c) détection du NO avec la sonde DAF-2DA dans un grain de pollen et long du tube pollinique lors d'une incompatibilité pollinique. Les flèches blanches signalent le tube pollinique. d) Détection du NO dans le stigmate lors d'une pollinisation compatible versus incompatible. Les flèches indiquent les tubes polliniques.

D'après Serrano et al., 2012

la déamination de l'ADN *in vitro* et *in vivo* expliquant probablement l'effet mutagène du NO (Wink *et al.*, 1991). De plus il a été montré que le peroxynitrite issu de la réaction du NO avec l'ion superoxyde engendre une oxydation et une nitration des lipides (Rubbo *et al.*, 2009).

Cet effet toxique du NO contribue à divers processus biologiques chez la plante. L'exemple le mieux connu est le rôle du NO dans les mécanismes de défense de l'hôte contre des pathogènes et notamment la contribution du NO à la mise en place de la réponse hypersensible (HR) (Romero-Puertas *et al.*, 2004). La HR qui est caractérisée par la mort des cellules végétales au site d'infection permet de contenir la propagation de la maladie et est par conséquent un mécanisme de résistance aux pathogènes. En outre, il a même été suggéré que la capacité d'une plante à être résistante ou sensible à un pathogène pourrait dépendre de sa capacité à accumuler du NO. En effet alors que du NO s'accumule fortement dans des cellules d'*A. thaliana* et de soja en réponse à une bactérie avirulente (pas de maladie) (Romero-Puertas *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2003), une modeste accumulation est observée chez ces 2 plantes lorsqu'elles sont mises en présence d'une bactérie virulente (développement de la maladie) (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les mécanismes de défense de la plante et notamment de la HR est avéré et Gaupels et ses collaborateurs proposent en 2011 que l'association des ROS et du NO formant le peroxynitrite soit responsable de la HR chez *A. thaliana* (Gaupels *et al.*, 2011).

Un autre exemple du rôle du NO est son implication dans la régulation de l'auto-incompatibilité du pollen (Serrano *et al.*, 2015). Chez certaines plantes dites allogames, lorsque leur propre pollen se fixe sur les cellules stigmatiques du pistil, un programme de mort cellulaire programmé (PCD) va être mis en place de façon à rejeter le pollen et empêcher l'auto fécondation (Figure 1a). Lors de l'auto-incompatibilité du pollen chez l'olivier, Serrano et ses collaborateurs en 2011 ont détecté du NO à la fois dans les cellules stigmatiques et dans le grain de pollen, ainsi que le long du tube pollinique naissant (Serrano *et al.*, 2012) (Figures 1b et 1c). En revanche du NO est détecté faiblement lors d'une interaction compatible (Figures 1d).

En conclusion l'effet du NO est dépendant de sa concentration. En réponse à un stimulus, le NO peut aussi bien avoir un rôle toxique qu'un rôle signal. C'est le cas par exemple, en réponse à un pathogène, où le NO permet l'induction de gènes de défense d'une part et participe au pouvoir oxydant d'autre part (Romero-Puertas *et al.*, 2004).

4) *Modes d'action du NO*

a) *La perception du NO*

L'induction d'une cascade de signalisation aboutissant à une réponse biologique débute par la perception du stimulus. Chez les animaux, la première étape de signalisation par le NO débute par l'activation de la guanylate cyclase (GC). L'interaction du NO avec le fer de l'hème de la GC conduit à la production du messenger secondaire, le GMP cyclique aboutissant à la mise en place de diverses réponses (Besson-Bard *et al.*, 2008). Chez les plantes, plusieurs articles démontrent la capacité du NO à induire la synthèse de GMP cyclique dans les tissus végétaux et dans des suspensions cellulaires (Besson-Bard *et al.*, 2008 pour revue). Cependant, à ce jour, aucune GC sensor de NO n'a été identifiée chez les plantes. Néanmoins, *in vitro*, il a été montré qu'une protéine d'*A. thaliana* capable de lier le NO possède une activité GC (Mulaudzi *et al.*, 2011).

La méconnaissance d'un sensor de NO chez les plantes n'a pas empêché l'étude des modes d'action du NO. A l'heure actuelle, on distingue 3 principaux modes d'action du NO dans la signalisation : 1) la modulation de la transcription de gènes 2) un cross-talk avec les messagers secondaires Ca^{2+} et les ROS 3) l'induction de modifications post-traductionnelles.

b) *La modulation de la transcription de gènes*

Plusieurs études à grande échelle réalisées chez différentes plantes (*A. thaliana*, *Medicago truncatula*, soja et tabac) et dans divers organes végétaux (racine, feuille...) ont permis d'identifier des gènes différentiellement exprimés suite à un traitement avec un donneur ou un piègeur de NO (Grün *et al.*, 2006 pour revue ; Ferrarini *et al.*, 2008). Ces études basées sur les techniques de microarray et d'amplification des ADNc par AFLP, ont révélé que plusieurs centaines de gènes sont induits par le NO. Ces gènes codent pour des fonctions cellulaires très variées (métabolisme primaire, processus photosynthétiques, trafic cellulaire, défense, synthèse et dégradation de ROS, réponse aux stress, transduction de signaux) en accord avec le rôle pléiotrope du NO dans la physiologie des plantes. Les limites d'interprétation de ces données de transcriptome à large échelle reposent sur la différence des profils transcriptomiques obtenus en fonction du donneur de NO et de l'organe considéré. En effet, Ferrarini et ses collaborateurs ont obtenu des profils différents selon qu'ils traitaient les plantes de *M. truncatula* avec le GSNO (nitrosogluthation) ou le SNP (nitroprussiate de sodium) comme donneur de NO (Ferrarini *et al.*, 2008). En outre, l'organe considéré est aussi

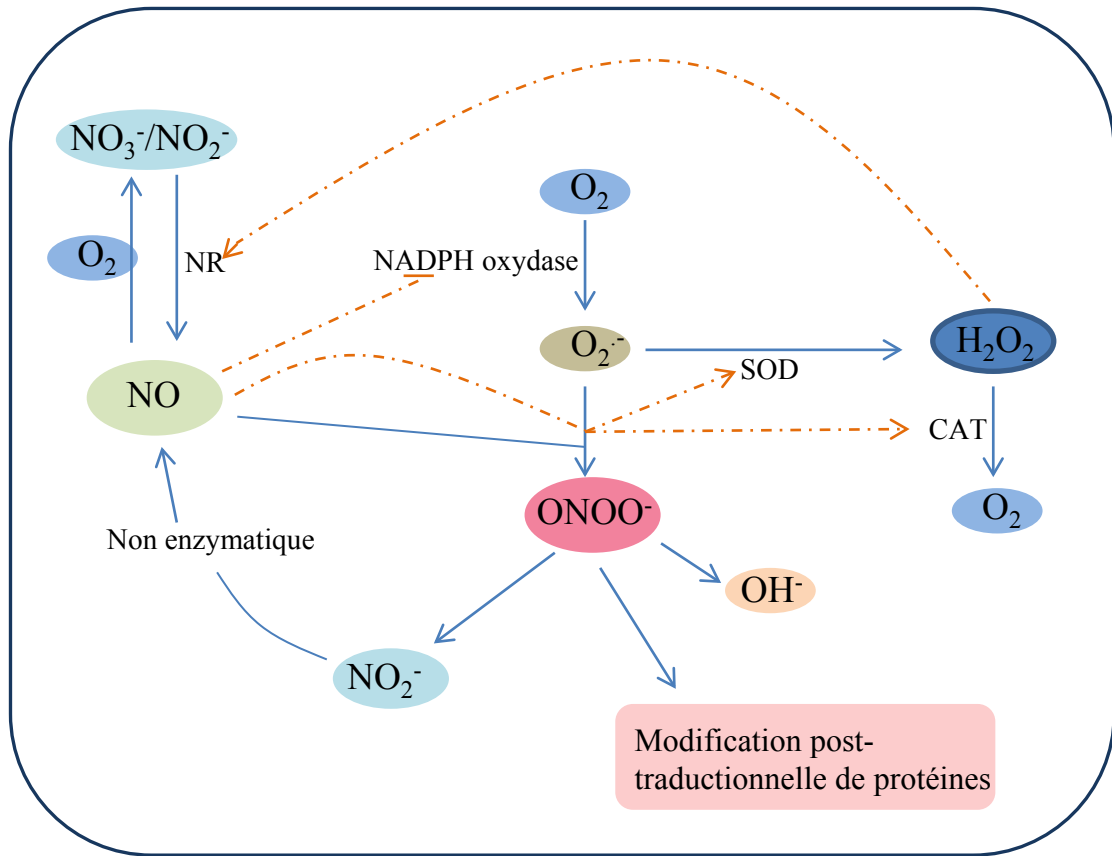


Figure 2: Cross talk entre NO et ROS dans les cellules végétales.

Les flèches bleues indiquent des réactions chimiques et les flèches oranges en pointillés signalent l'effet activateur ou inhibiteur de la molécule sur une protéine cible.

NR: Nitrate Reductase, SOD: SuperOxide Dismutase, CAT: Catalase, NO_3^- : nitrates, NO_2^- : nitrites, ONOO^- : peroxynitrite.

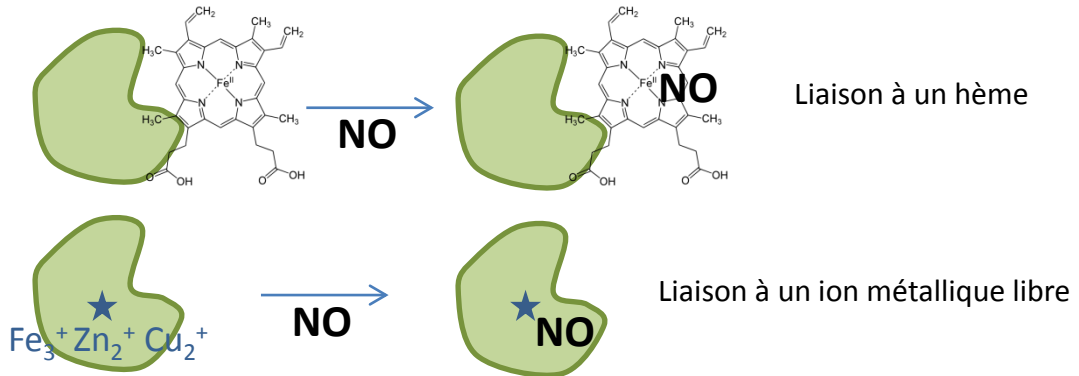
important puisque l'expression des gènes n'est pas la même dans les racines et dans les feuilles (Ferrarini *et al.*, 2008). Enfin, pour étudier le rôle du NO dans les interactions biotiques, l'expression des gènes induits par le NO a été comparée entre des racines de *M. truncatula* traitées avec le symbionte rhizobium et les feuilles traitées avec un champignon pathogène (Ferrarini *et al.*, 2008). L'étude révèle que 47 gènes sont différentiellement exprimés entre les 2 conditions et que notamment les gènes responsables de la mise en place de la HR sont induits suite à l'inoculation des feuilles avec le champignon suggérant un rôle potentiel du NO dans la mise en place de la HR.

c) Cross-talk du NO avec les messager secondaires Ca^{2+} et ROS

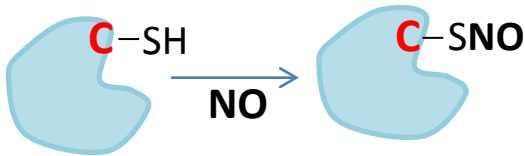
Le Ca^{2+} est un messager secondaire retrouvé chez tous les êtres vivants. Pour un organisme donné il va assurer la transduction du signal en réponse à des centaines de stimuli différents soulevant la question de sa spécificité d'action. Il a été montré que le Ca^{2+} présente une signature (fréquence, durée, amplitude des oscillations calciques) qui est unique en réponse à un stimulus (McAinsh and Pittman, 2009).

Pour le NO, qui est à ce jour considéré comme une molécule ubiquitaire et qui est retrouvé en réponse à de nombreux stress, la spécificité d'action est à ce jour méconnue. Néanmoins, il est proposé que la spécificité d'action du NO s'établisse via la signature calcique (Besson-Bard *et al.*, 2008a). Chez les animaux, le NO gouverne l'homéostasie calcique en contrôlant tous les types de canaux et transporteurs du Ca^{2+} (Clementi, 1998). Le NO module leurs activités soit directement par modification post-traductionnelle (voir le paragraphe suivant) soit indirectement via l'action d'un autre messager secondaire, le GMP cyclique, dont la synthèse est induite par le NO (Clementi, 1998). Chez les végétaux, la première évidence de la régulation des canaux calciques par le NO vient principalement des études menées sur les cellules de garde des stomates (Domingos *et al.*, 2015). Il a été montré que la fermeture des stomates médiée par le couple Acide absissique (ABA)/ Ca^{2+} en réponse à un stress abiotique ou biotique (sécheresse, attaque de pathogène) est corrélée à une augmentation de la concentration de NO dans les cellules de garde (Bright *et al.*, 2006 ; Agurla *et al.*, 2014). En outre, Garcia-Mata et ses collaborateurs ont montré qu'une élévation de la concentration en Ca^{2+} est dépendante du NO et est essentielle pour inactiver les canaux potassiques et donc permettre la plasmolyse des cellules de garde (Garcia-Mata *et al.*, 2003). De plus, des cellules de tabac traitées avec un donneur de NO accumulent du Ca^{2+} et, à

- Métal-nitrosylation



- S-nitrosylation



- Tyrosine nitration

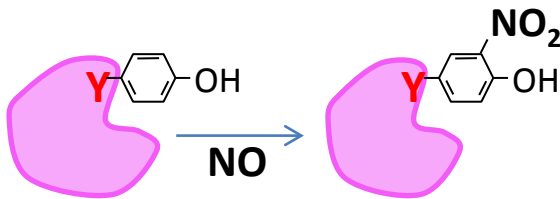


Figure 3: Représentation schématique des modifications post-traductionnelles de protéines dépendantes du NO

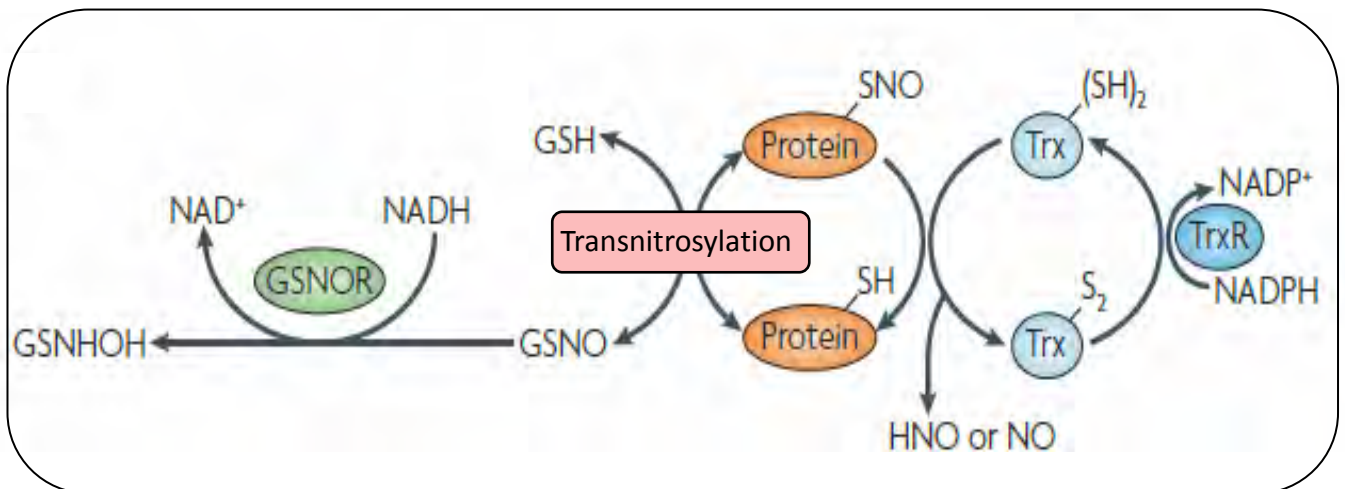


Figure 4: Mécanismes de transnitrosylation et de dénitrrosylation par les thiorédoxines (Trx) et les GSNO réductases (GSNOR).

Trx dénitrrosyle les protéines S-nitrosylées formant une thioredoxine oxydée qui est à son tour réduite par une thioredoxine reductase (TrxR). Une protéine S-nitrosylée peut aussi être dénitrrosylée par le glutathion (GSH) formant le nitrosogluthation (GSNO) (réaction de trans-nitrosylation) qui est à son tour réduit par la GSNO réductase (GSNOR).

D'après Benhar et al., 2009

l'inverse, un traitement avec un piègeur de NO diminue l'augmentation de Ca^{2+} en réponse à l'éliciteur cryptogéine (Lamotte *et al.*, 2004).

De plus en plus d'évidences suggèrent l'implication d'un troisième partenaire dans le couple NO/ Ca^{2+} : les espèces réactives de l'oxygène ou ROS. En effet, en plus de leur pouvoir oxydant, les ROS telles que le radical hydroxyle (OH^\cdot), l'ion superoxyde (O_2^\cdot) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont impliquées dans la signalisation de processus biologiques et participent de façon soit synergique soit antagoniste avec le NO dans la mise en place d'une réponse adaptée (Wang *et al.*, 2013). Le cross-talk entre ces 2 molécules fait intervenir tout d'abord la régulation de la synthèse et/ou de la dégradation de l'un par l'autre (et inversement) (Figure 2). En effet, par exemple, le NO va inhiber l'activité d'AtRBOHD, une NADPH oxydase d'*A. thaliana* qui transforme l' O_2 en ion superoxyde (Yun *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'association du NO et des ROS forme de nouvelles molécules avec de nouvelles propriétés. Un exemple bien connu est l'association du NO et de l'ion superoxyde qui donne du péroxynitrite (ONOO^\cdot) (Figure 2). Cette molécule serait à l'origine de l'induction de modifications post-traductionnelles appelées tyrosine nitrations (Cf paragraphe suivant). Un exemple d'implication des ROS et du NO dans un processus avec des rôles antagonistes est patent lors de la sénescence foliaire. En effet, à l'inverse des ROS qui ont une fonction activatrice de la sénescence des feuilles, le NO, à certaines concentrations, la retarde (Wang *et al.*, 2013). Il a été proposé que le NO antagonise l'effet toxique des ROS (Wang *et al.*, 2013).

d) Les modifications post-traductionnelles par le NO

Il existe 3 types de modifications post-traductionnelles causées par le NO : la Métal-nitrosylation, la S-nitrosylation et la Tyrosine nitration (Figure 3).

Métal nitrosylation: Grâce à ses propriétés chimiques, le NO peut interagir avec des atomes métalliques contenus dans les protéines. Plus précisément, le NO lie le fer, le zinc et le cuivre localisés soit au sein d'un hème, soit libres dans la protéine (Ford, 2010). Cette modification post-traductionnelle et réversible de protéines, appelée métal-nitrosylation, peut induire un changement de conformation impactant l'activité ou la réactivité de la protéine ciblée (Ford, 2010).

Chez les végétaux, une des protéines les mieux caractérisées pour être métal-nitrosylée est l'hémoglobine. Il existe 3 classes d'hémoglobines basées sur leurs propriétés structurales et sur leur affinité de liaison à l'oxygène et au NO : les hémoglobines symbiotiques ou

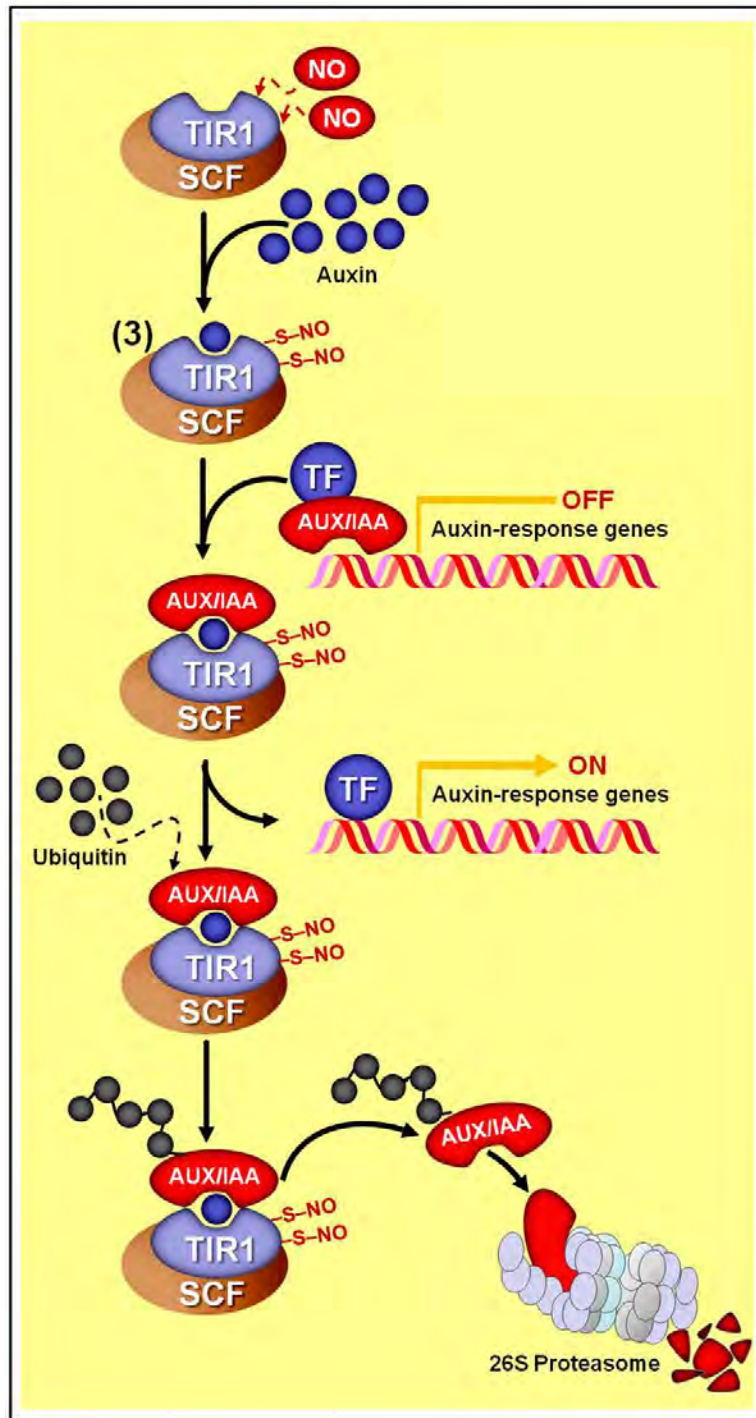


Figure 5: S-nitrosylation de TIR1 et induction de la voie de signalisation de l'auxine.

La protéine TIR1 qui est le récepteur à l'auxine interagit avec le complexe E3-ubiquitine ligase SCF. En présence d'auxine, TIR1 va être S-nitrosylée, ce qui permet son interaction avec les répresseurs transcriptionnels de l'auxine AUX/IAA. Ces derniers vont être ubiquitinylés puis dégradés par le protéasome 26S. Ainsi la voie de signalisation de l'auxine est activée.

D'après Freschi, 2013

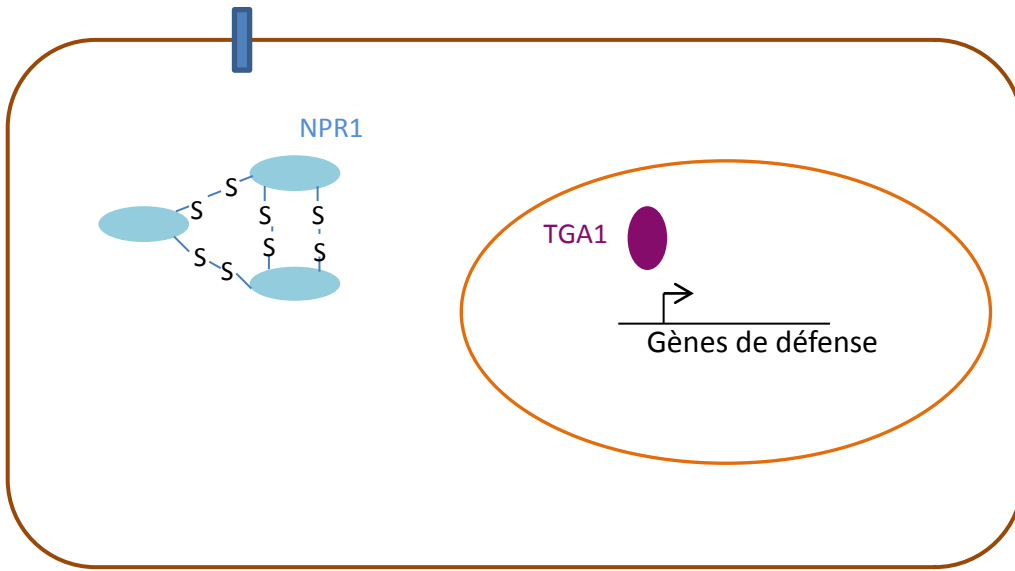
leghémoglobines qui sont trouvées dans les nodules symbiotiques fixateurs d'azote ; les hémoglobines non symbiotiques présentes chez toutes les plantes et les hémoglobines tronquées (Gupta *et al.*, 2011). Il a été montré ces dernières années, que les 2 premières classes d'hémoglobines (symbiotique et non-symbiotique) peuvent être oxydées par le NO au niveau du fer de l'hème (Navascués *et al.*, 2012; Igamberdiev and Hill, 2004). Cette métal nitrosylation des hémoglobines conduit à la formation de nitrate et met en lumière un nouveau rôle des hémoglobines (en plus de celui de transporteur d'oxygène) : celui de piègeur de NO. Une autre protéine métal-nitrosylée est la cytochrome c oxydase (COX) (Parihar *et al.*, 2008). Cette enzyme vitale, qui est l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale, est inhibée par métal-nitrosylation illustrant par la même une des causes des effets toxiques du NO (Parihar *et al.*, 2008).

S-nitrosylation : La S-nitrosylation qui est la modification post-traductionnelle dépendante du NO la plus étudiée dans le règne végétal résulte de la liaison covalente d'un NO sur le groupement thiol d'une cystéine (formation d'un S-nitrosothiol). Bien que des cystéines soient présentes dans la majorité des protéines, la S-nitrosylation est restreinte à des cystéines spécifiques. Actuellement il n'y a pas de motif de S-nitrosylation connu mais une cystéine entourée d'un acide aminé acide et basique et présente dans un environnement hydrophobe, aurait une S-nitrosylation facilitée (Astier *et al.*, 2012). En outre, la S-nitrosylation d'une protéine peut s'effectuer par le transfert d'un groupe NO contenu dans un S-nitrosothiol d'une protéine déjà S-nitrosylée lors d'une réaction appelée transnitrosylation (Astier *et al.*, 2012). Le glutathion (GSH) S-nitrosylé (S-nitroso-glutathion ou GSNO) est le seul exemple connu à ce jour capable de transnitrosyler une protéine cible et l'accessibilité d'une cystéine au GSNO est un autre élément déterminant la spécificité de S-nitrosylation (Figure 4).

La S-nitrosylation, comme la plupart des modifications post-traductionnelles, est réversible. En effet, en plus de la dénitrosylation spontanée, il existe des protéines capables de dénitrosyler les cystéines modifiées : les thiorédoxines (Trx) et les GSNO réductases (GSNOR) (Figure 4 ; Benhar *et al.*, 2008; Benhar *et al.*, 2009).

La formation de S-nitrosothiols peut conduire à un changement de conformation des protéines qui peut modifier l'activité, la localisation ou la stabilité de la protéine cible (Astier *et al.*, 2012). Chez les plantes, les S-nitrosylations participent à divers mécanismes tels que l'immunité, la régulation hormonale et le métabolisme carboné (Astier *et al.*, 2012). Comme vu précédemment, le NO inhibe l'activité d'AtRBOHD, une NADPH oxydase. Il a été montré

Absence de pathogène



Présence de pathogène

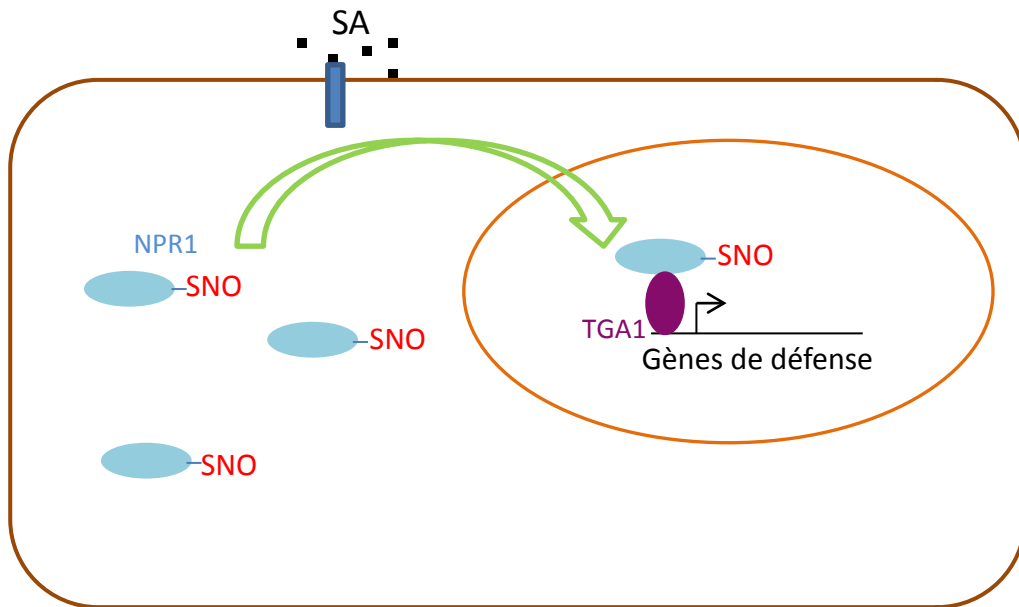


Figure 6: S-nitrosylation de NPR1 et induction des gènes de défense

En absence de pathogène, NPR1 est localisée dans le cytosol sous forme d'oligomère. L'oligomère est permis grâce à la formation de ponts disulfures entre les monomères. Suite à une attaque par un pathogène, de l'acide salicylique va être synthétisé. La perception de cette hormone va conduire à la S-nitrosylation de l'oligomère de NPR1 qui va alors se dissocier. Les monomères ainsi libérés vont migrer dans le noyau pour interagir avec le facteur de transcription TGA1 et induire la transcription des gènes de défense.

que cette inhibition résulte de la S-nitrosylation de la Cys890, limitant ainsi la synthèse des ROS et la réponse hypersensible de la plante. En outre, une mutation ponctuelle de cette cystéine provoque une réaction hypersensible plus intense (Yun *et al.*, 2011). Récemment, chez *A. thaliana*, il a été montré que la protéine TIR1 qui est le récepteur de l'auxine et qui interagit avec le complexe E3-ubiquitine ligase SCF (complexe qui ubiquitine une protéine cible ce qui constitue un signal d'adressage au protéasome 26S) est S-nitrosylée (Figure 5). Cette modification permet l'interaction de TIR1 avec les répresseurs transcriptionnels Aux/IAA. Ces derniers vont être ubiquitinylés puis dégradés par le protéasome 26S. Ainsi la voie de signalisation de l'auxine est activée (Figure 5 ; Terrile *et al.*, 2012; Freschi, 2013). Par ailleurs, il a été montré que la S-nitrosylation d'une protéine peut aussi influencer sur la localisation subcellulaire de la protéine ciblée. Un exemple est la protéine NPR1 d'*A. thaliana*, le régulateur majeur de la voie de signalisation de l'acide salicylique en réponse à un pathogène (Lindermayr *et al.*, 2010). En absence de pathogène, NPR1 est localisée dans le cytosol sous forme d'oligomère (Figure 6). L'oligomère est formé grâce à des ponts disulfures entre les monomères. Suite à une attaque par un pathogène, de l'acide salicylique va être synthétisé. La perception de cette hormone va conduire à la S-nitrosylation de l'oligomère de NPR1 qui va alors se dissocier. Les monomères ainsi libérés vont migrer dans le noyau pour interagir avec le facteur de transcription TGA1 et induire la transcription des gènes de défense (Figure 6).

Tyrosine nitration : La tyrosine nitration est la liaison d'un groupement NO₂ au niveau d'un groupe OH du noyau aromatique de la tyrosine. Le groupe NO₂ provient principalement du peroxy-nitrite (ONOO⁻) qui dans des conditions physiologiques peut réagir avec le CO₂ pour être ensuite décomposé en CO₃⁻ et NO₂ (Astier and Lindermayr, 2012).

Cette modification n'est pas aléatoire. En effet ni l'abondance d'une protéine ni son pourcentage en tyrosines n'influent sur la tyrosine nitration. Bien qu'il n'y ait pas de séquence consensus définie à ce jour, la structure secondaire de la protéine ainsi que l'environnement local de la tyrosine participeraient à la spécificité de la tyrosine nitration. En effet, la majorité des tyrosines nitrées sont retrouvées au niveau de boucles et la proximité d'une charge négative serait aussi bénéfique (Abello *et al.*, 2009).

Due à sa grande stabilité *in vitro* (à pH acide et basique, à 100 °C) et à la méconnaissance de systèmes de dénitrification, la tyrosine nitration a d'abord été décrite comme étant une modification post-traductionnelle irréversible. Cependant de plus en plus

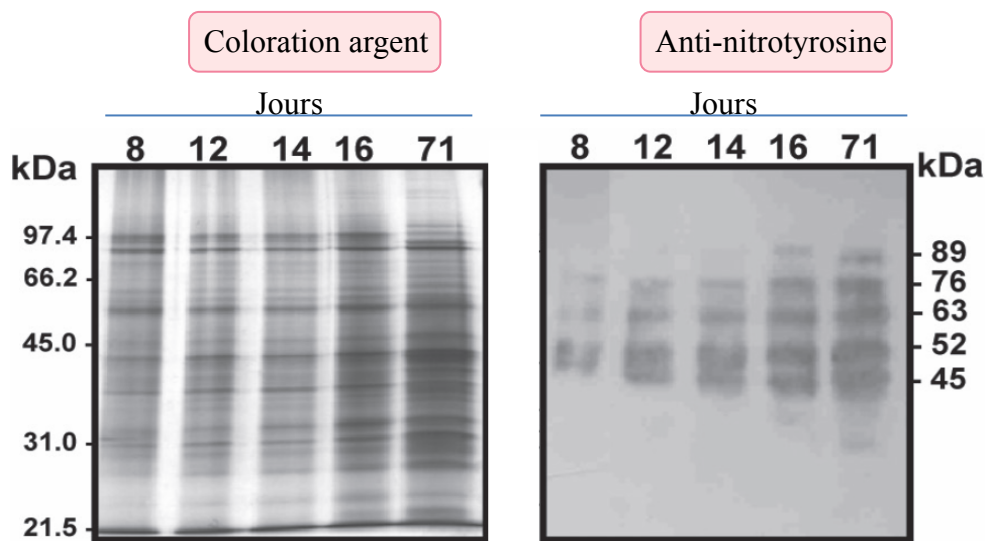


Figure 7: Profils des protéines tyrosines nitratées de racine de pois en fonction du temps (jours post-germination). A gauche, gel coloré au nitrate d'argent révélant les protéines totales et à droite résultat d'un Western blot anti nitro-tyrosine

Begara-Morales *et al.*, 2013

| Protéine | Espèce végétale | Localisation | Effet | Tyr nitratée identifiée | Références |
|-----------------------------------|---|--------------------------------|------------|-------------------------|-------------------------------------|
| S-adenosyl homocysteine hydrolase | Tournesol | Noyau | Inhibition | Tyr-448 | Chaki <i>et al.</i> , 2009 |
| Ferredoxin-NADP réductase | Tournesol | Chloroplaste | Inhibition | NI | Chaki <i>et al.</i> , 2011 |
| Anhydrase carbonique | Tournesol | Chloroplaste | Inhibition | Tyr-205 | Chaki <i>et al.</i> , 2013 |
| PSBA(D1) du photosystème II | <i>A. thaliana</i> | Chloroplaste | Inhibition | Tyr-262 | Galetskiy <i>et al.</i> , 2011 |
| Methionine synthase | <i>A. thaliana</i> | Cytosol | Inhibition | Tyr-287 | Lozano-Juste <i>et al.</i> , 2011 |
| Glutamine synthase | <i>Medicago truncatula</i> | Cytosol | Inhibition | Tyr-167 | Melo <i>et al.</i> , 2011 |
| O-acetylserine lyase A1 | <i>A. thaliana</i> | Cytosol | Inhibition | Tyr-302 | Alvarez <i>et al.</i> , 2011 |
| Glyceraldehyde-3-P dehydrogenase | <i>A. thaliana</i> | Chloroplaste | Inhibition | NI | Lozano-Juste <i>et al.</i> , 2011 |
| NADP-isocitrate dehydrogenase | Pois | Cytosol | Inhibition | Tyr-392 | Begara-Morales <i>et al.</i> , 2013 |
| Tubuline α | Cultures cellulaires d' <i>A. thaliana</i> , tabac et riz | Microtubules | Inhibition | NI | Jovanovic <i>et al.</i> , 2010 |
| Leghémoglobine | Haricot, Soja | Cytosol des cellules du nodule | ? | Tyr-30 | Sainz <i>et al.</i> , 2015 |

Figure 8: Liste des protéines végétales tyrosine nitratées étudiées à ce jour
NI= Non Identifiée

d'évidences tendent à démontrer qu'il existe un système de dénitrification (Abello *et al.*, 2009 ; Deeb *et al.*, 2013). En effet, en 2013, dans les cellules endothéliales humaines et de souris, Ruba et ses collaborateurs ont caractérisé une activité dénitrifase capable de réverser la tyrosine nitration de la cyclooxygénase 1 (COX-1) (Deeb *et al.*, 2013). Chez les plantes, des analyses protéomiques réalisées chez *A. thaliana* ont montré que l'augmentation de la nitration des protéines suite à un traitement avec un pathogène est transitoire, suggérant que ce mécanisme est réversible (Cecconi *et al.*, 2009).

L'étude de cette modification a principalement été basée sur 2 méthodes : l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les nitro-tyrosines permettant la détection en Western blot et l'utilisation de techniques d'enrichissement des protéines tyrosine-nitrées (immunoprécipitation et chromatographie) couplées à leur identification par spectrométrie de masse (Abello *et al.*, 2009).

Des études à grande échelle ont permis l'identification chez différentes espèces végétales, de centaines de protéines tyrosines nitrées appartenant à des familles très variées (oxydase, réductase, synthétase, chaperonne, protéase, facteur de transcription, tubulline, catalase) et impliquées dans des voies métaboliques diverses (Lozano-Juste *et al.*, 2011; Cecconi *et al.*, 2009). Ces modifications du statut de tyrosine nitration sont observées en réponse à des stimuli extérieurs tel que l'attaque par un pathogène (Cecconi *et al.*, 2009) mais aussi lors du développement de la plante. Ainsi le profil des protéines tyrosine nitrées évolue en fonction de l'âge de la racine du pois (Begara-Morales *et al.*, 2013 ; Figure 7). La nitration de la tyrosine induit un changement de la conformation de la protéine cible pouvant entraîner un changement d'activité. Chez les plantes, seulement une dizaine d'études ont déterminé l'effet de la tyrosine nitration sur l'activité des protéines et dans la majorité des cas la tyrosine nitration a un rôle inhibiteur (Figure 8; Chaki *et al.*, 2009 ; Chaki *et al.*, 2011; Chaki *et al.*, 2013; Jovanović *et al.*, 2010; Galetskiy *et al.*, 2011 ; Lozano-Juste *et al.*, 2011 ; Melo *et al.*, 2011 ; Alvarez *et al.*, 2011 ; Begara-Morales *et al.*, 2013; Sainz *et al.*, 2015). Par exemple, dans les nodules symbiotiques de *M. truncatula*, il a été démontré que la glutamine synthétase (GS), une enzyme clé du métabolisme azoté, est inhibée par tyrosine nitration (Melo *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'alternance entre une tyrosine non modifiée et une tyrosine nitrée à l'extrémité de la tubuline serait à l'origine de la dynamique des microtubules du cytosquelette et par conséquent à la base des divisions cellulaires (Blume *et al.*, 2013).

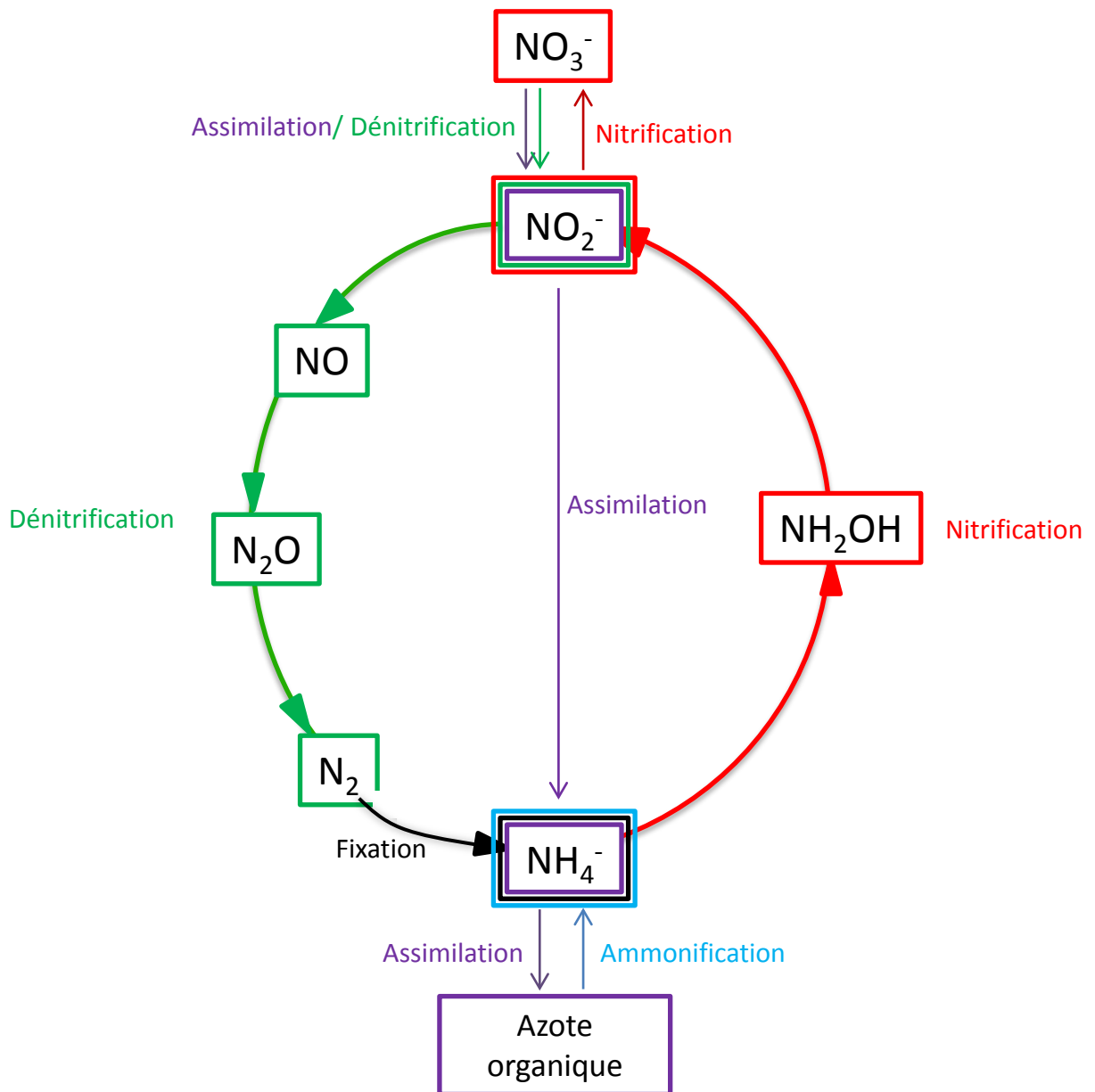


Figure 9: cycle de l'azote microbien
D'après Jetten 2008

Il est intéressant de mentionner qu'une protéine peut faire l'objet d'une double régulation post-traductionnelle par le NO. En effet, la protéine APX du pois qui est une peroxydase (enzyme impliquée à la fois dans la synthèse et la dégradation des ROS) est inhibée par tyrosine nitration et activée par S-nitrosylation (Begara-Morales *et al.*, 2014).

En conclusion, le NO agit dans différents processus biologiques de la plante, de son développement à la réponse à des signaux extérieurs, et son rôle est dépendant de sa concentration. Lors d'une interaction avec un pathogène, le NO agit comme une molécule toxique impliquée dans la mise en place des défenses de la plante, soulevant la question de comment les bactéries font face au NO particulièrement lors d'une interaction compatible c'est-à-dire aboutissant à la maladie.

II) Les réponses des bactéries au NO

Pour étudier la question de la réponse bactérienne au NO, il convient de se demander où les bactéries rencontrent cette molécule. Tout d'abord, le NO a été identifié comme étant un élément clé de l'immunité animale et végétale. L'exemple le mieux décrit est la synthèse de NO par les macrophages au niveau des phagosomes en réponse à des bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* ou encore *Mycobacterium tuberculosis* (Tripathi *et al.*, 2007). Des analyses phylogéniques basées sur des gènes codant pour des régulateurs dépendant du NO, ont révélé la présence possible de mécanismes de réponse au NO chez de nombreuses bactéries non pathogènes, suggérant que les bactéries ne font pas face au NO uniquement lors d'interactions hôtes/ pathogènes (Rodionov *et al.*, 2005). En effet, à l'état libre, les bactéries et d'autres microorganismes (archées, champignons) sont capables de synthétiser eux-mêmes du NO selon différentes réactions qui participent directement ou indirectement à la production de NO (Figure 9, (Jetten, 2008). Par exemple, la voie de dénitrification qui est la réduction complète du nitrate (NO_3^-) en azote gazeux (N_2) assure à la fois la synthèse et la dégradation du NO. Par ailleurs, récemment, du NO a été détecté lors d'interactions symbiotiques comme lors de la symbiose entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et la bactérie *Sinorhizobium meliloti* ou encore lors de la symbiose entre le calmar et la bactérie *Vibrio fischeri* (Wang and Ruby, 2011).

A l'état libre ou en interaction, les bactéries rencontrent donc constamment du NO et ont par conséquent développé des systèmes de réponse au NO qui débutent par la perception de cette molécule.

| Régulateurs | Signaux | Famille | Action | Domaine régulateur | Exemples de bactéries |
|--|-------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------|--|
| <u>Régulateurs spécifiques du NO</u> | | | | | |
| NorR | NO | EBP | Activation | Fer libre | <i>Vibrio cholerae</i> <i>E. coli</i> |
| NnrR | NO | FNR-CRP | Activation | Cluster Fe-S ? | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i> |
| DNR | NO | FNR-CRP | Activation | Fer de l'hème | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> |
| NsrR | NO | FNR-CRP | Répression | Cluster Fe-S | <i>Nitrosomonas europae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Bacillus subtilis</i> |
| <u>Régulateurs non-spécifiques du NO</u> | | | | | |
| SoxR | NO, O ₂ ⁻ | | Activation | Cluster Fe-S | <i>E. coli</i> <i>Salmonella enterica</i> |
| FNR | NO, O ₂ | FNR-CRP | Activation Répression | Cluster Fe-S | <i>E. coli</i> |
| OxyR | H ₂ O ₂ , SNO | Famille LysR | Activation | Cystéine | <i>E. coli</i> <i>Salmonella typhimurium</i> |
| FixLJ | μO ₂ , NO | Système à 2 composants | Activation | Fer de l'hème | <i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Caulobacter crescentus</i> |
| DosRST | μO ₂ , NO | Système à 2(3) composants | Activation | Fer de l'hème | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> |

Figure 10: Régulateurs bactériens répondant au NO
EBP= Enhancer Binding Protein; FNR-CRP=Fumarate Nitrate Reductase-cAMP Receptor Protein; μO₂= microaérobiose
D’après Stern and Zhu, 2014; Storz and Spiro 2011

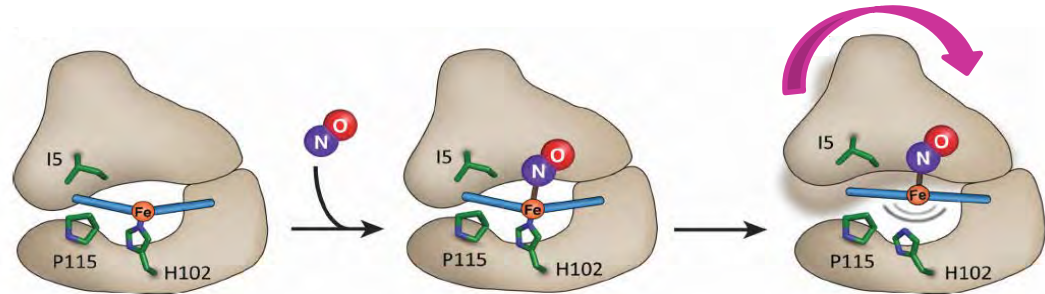


Figure 11: Mécanisme d’activation d’un senseur H-NOX par le NO.
En absence d’interaction avec le NO, l’hème est déformé à cause des liaisons de Van-Der-Waals entre l’isoleucine 5 (I5), la proline 115 (P115) et l’hème et de la liaison ionique entre l’histidine 102 (H102) et le fer de l’hème. L’interaction avec le NO fragilise la liaison entre l’histidine et le fer qui se rompt permettant à l’hème d’adopter une conformation plane. Ce changement de conformation de l’hème aboutit à la rotation de la protéine permettant ainsi son activation.
D’après Plate et Marletta, 2013

1) Les systèmes senseurs bactériens du NO

Chez les bactéries, de nombreux régulateurs transcriptionnels ont été décrits comme étant capables de lier le NO ou ses dérivés (Spiro, 2007). Plusieurs types d'interactions avec le NO ont été décrites : -liaison du NO avec un ion ferrique contenu dans un groupement hème (H-NOX (Hème NO/Oxygène) régulateurs)) –liaison du NO au niveau d'un ion ferrique libre – liaison du NO au niveau d'un cluster Fer-Soufre (Fe-S) –liaison du NO avec le groupement thiol d'une cystéine (SNO) (Figure 10). Ces senseurs de NO appartiennent à des familles différentes, la famille FNR-CRP (Fumarate Nitrate Reductase- cAMP Receptor Protein) étant la plus représentée. Les protéines de la famille FNR-CRP contiennent 3 domaines caractéristiques : un domaine N-terminal senseur, un long domaine de dimérisation contenant une hélice α et un domaine de liaison à l'ADN caractérisé par un motif hélice-tour-hélice (Zumft, 2002).

L'interaction du NO avec un régulateur conduit à un changement de conformation de la protéine et à l'activation ou l'inhibition du régulateur (Figure 11, d'après (Plate and Marletta, 2013)).

Il existe 2 types de régulateurs répondant au NO : -les régulateurs spécifiques du NO
-les régulateurs non spécifiques du NO capables de se lier au NO mais de répondre aussi à d'autres molécules (Figure 10).

a) Les régulateurs spécifiques du NO

Plusieurs régulateurs spécifiques du NO ont été décrits. Parmi eux, NnrR a été étudié. D'abord identifié chez *Rhodobacter sphaeroides*, il a aussi été décrit chez d'autres bactéries telles que *Sinorhizobium meliloti* et *Agrobacterium tumefaciens*. NnrR présente un cluster Fer-Soufre mais il n'y pas d'évidence directe de son interaction avec le NO. Chez *Rhodobacter sphaeroides*, ce régulateur est requis pour l'expression des gènes codant pour une nitrite reductase (*nirK*) et une NO reductase (*norB*) d'où son nom NnrR pour « Nitrite and Nitric oxide Reductase Regulator » (Tosques *et al.*, 1996). NorB et NirK appartiennent à la voie de dénitrification qui est la réduction complète des nitrates (NO_3^-) en azote gazeux (N_2) via les intermédiaires nitrites (NO_2^-), NO et oxyde nitreux (N_2O) et grâce à l'action des enzymes nitrate réductase (Nap), nitrate réductase (Nir), NO réductase (Nor) et N_2O réductase

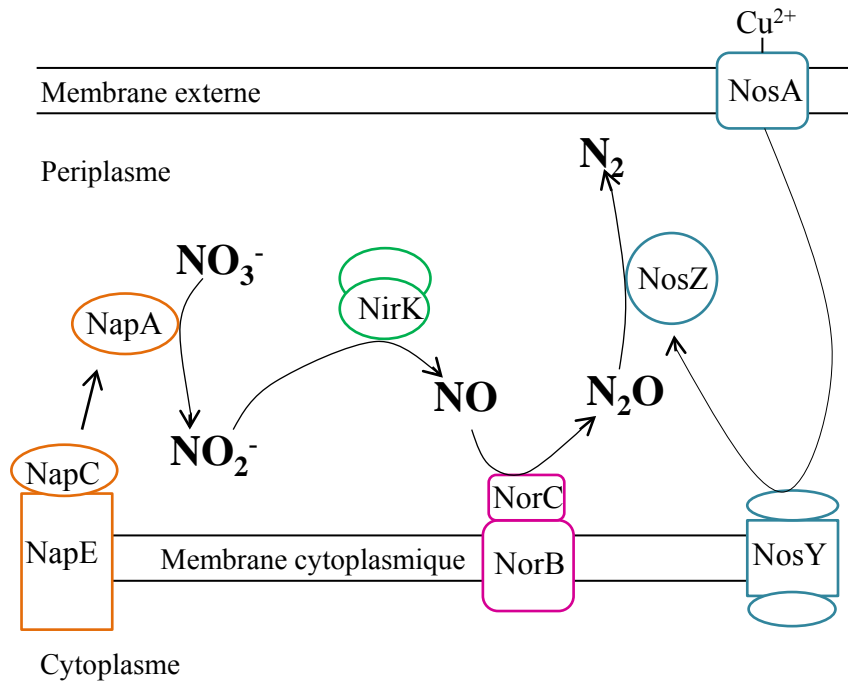


Figure 12: Voie de dénitrification.

La dénitrification est la réduction complète des nitrates (NO_3^-) en azote gazeux (N_2) via les intermédiaires nitrites (NO_2^-), NO et oxyde nitreux (N_2O) et grâce à l'action des enzymes nitrate réductase (Nap), nitrate réductase (Nir), NO réductase (Nor) et N_2O réductase (Nos) respectivement.

D'après la thèse de House 2003

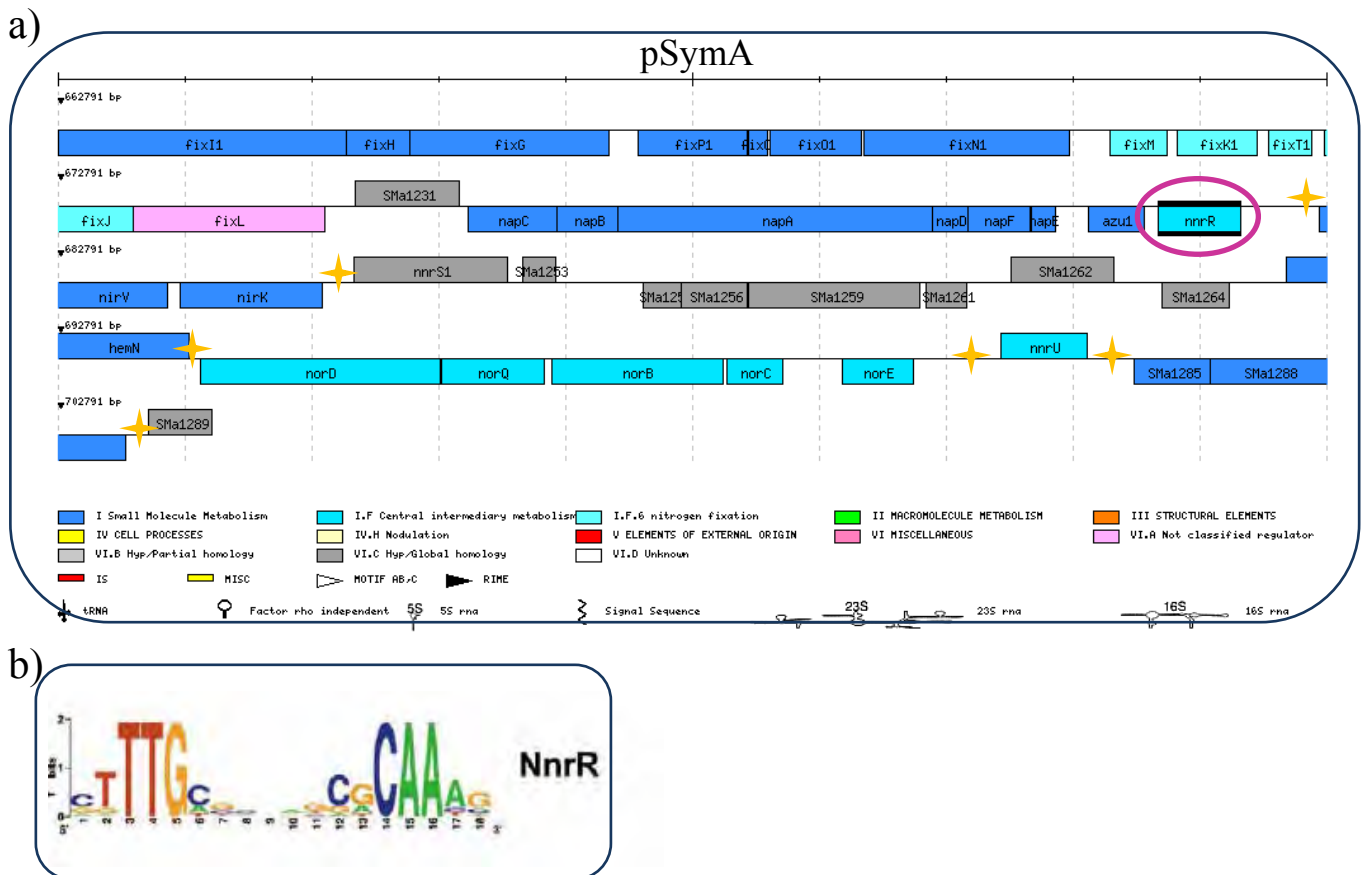


Figure 13: Localisation de NnrR sur le plasmide pSymA et séquence de reconnaissance sur l'ADN

a- Représentation schématique d'une région de 41 kb du plasmide pSymA. Les rectangles symbolisent les phases ouvertes de lecture des gènes et les étoiles signalent les promoteurs reconnus par NnrR b- Motif de reconnaissance de NnrR

D'après Rodionov et al, 2005 et Meilhoc et al., 2010

(Nos) respectivement (Figure 12). La dénitrification est un processus respiratoire alternatif en condition d'oxygène limitant. En effet les bactéries peuvent utiliser les intermédiaires de la voie de dénitrification comme accepteurs finaux d'électron et ainsi continuer à produire l'ATP (Tosques *et al.*, 1996). Plus récemment, NnrR a aussi été caractérisé chez *S. meliloti*. Chez cette bactérie symbiotique fixatrice d'azote, NnrR est un régulateur majeur de la réponse au NO qui contrôle aussi l'expression des gènes de dénitrification tels que *nirK* et *norB* (Meilhoc *et al.*, 2010). Localisé sur le plasmide symbiotique pSymA de *S. meliloti* à proximité des gènes de dénitrification, NnrR reconnaît une séquence consensus dans les régions promotrices des gènes régulés (Figure 13, Rodionov *et al.*, 2005 ; Meilhoc *et al.*, 2010).

Un autre senseur spécifique du NO est le régulateur NorR retrouvé chez les bactéries *E. coli* et *Vibrio cholerae*. NorR qui appartient à la famille des facteurs EBP (Enhancer Binding Protein) est activé suite à la liaison du NO au niveau du fer de l'hème (Stern and Zhu, 2014). NorR qui reconnaît le motif consensus GT-N₇-AC est nécessaire à la pathogénicité de *Vibrio cholerae* (Stern *et al.*, 2012).

b) Les régulateurs non-spécifiques du NO

Un exemple de régulateur non spécifique du NO est OxyR d'*E. coli*. La première fonction identifiée d'OxyR était de répondre à un stress oxydant. En effet, en réponse à un stress oxydant, OxyR activé va induire la transcription d'une trentaine de gènes impliqués dans la résistance à ce stress tels que les gènes codant pour des catalases ou des glutathion réductases (Storz *et al.*, 1990). En 2012, Seth et ses collaborateurs ont montré qu'OxyR est aussi un régulateur majeur du stress nitrosatif (stress induit par les espèces réactives de l'azote tel que le NO ; Seth *et al.*, 2012). En effet, en réponse à un stress nitrosatif, OxyR activé par S-nitrosylation va induire la transcription de gènes impliqués dans la dénitrosylation des protéines. Ce régulon est différent de celui activé en réponse à un stress oxydatif (Seth *et al.*, 2012).

Un autre régulateur non spécifique du NO bien décrit est FixL. Ce régulateur qui est retrouvé chez de nombreuses rhizobia, dont *S. meliloti*, a d'abord été identifié pour être le régulateur majeur de réponse à la microaérobie aussi bien lorsque les bactéries sont en vie libre qu'en interaction symbiotique avec les plantes de la famille des légumineuses (Bobik *et al.*, 2006). FixL, un senseur histidine kinase forme un système à 2 composants avec FixJ, le régulateur de réponse. A faible concentration d'oxygène, FixL s'autophosphoryle et transfère son phosphate à FixJ, ce qui a pour effet de l'activer. FixJ phosphorylé va induire la

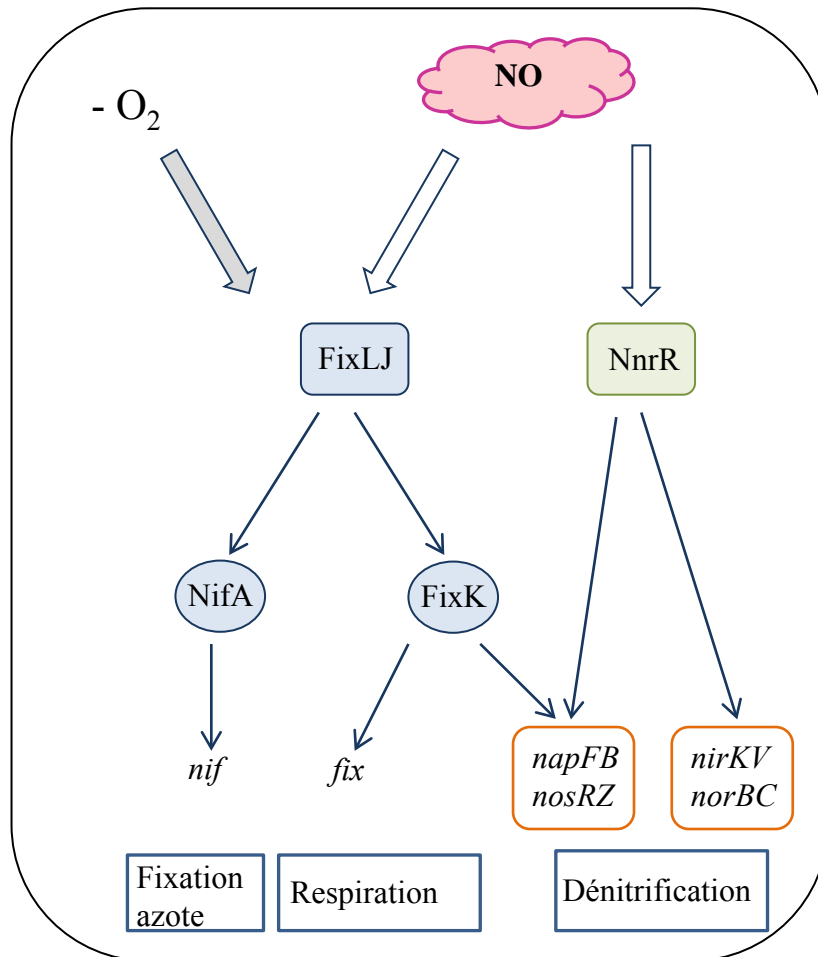


Figure 14: Régulation de la réponse au NO chez *S. meliloti*
D'après Meilhoc et al, 2010

transcription de 2 gènes codant pour les régulateurs intermédiaires FixK et NifA, responsables de l'activation des gènes *fix* (impliqués dans la respiration), de certains gènes de la voie de dénitrification et des gènes *nif* (fixation symbiotique de l'azote) (Figure 14, Meilhoc *et al.*, 2011). En 2010, il a été montré que ce système à 2 composants FixLJ est aussi un régulateur majeur de la réponse au NO chez *S. meliloti* (Meilhoc *et al.*, 2010). En effet, le NO qui est capable de se lier au fer de l'hème de FixL avec une meilleure affinité que l'oxygène active le système à 2 composants probablement en rentrant en compétition avec l'oxygène qui est la seule molécule capable d'inhiber FixL (Gilles-Gonzalez *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter, qu'une même bactérie peut disposer de plusieurs systèmes senseurs du NO. En effet, par exemple, *S. meliloti* possède un système senseur spécifique du NO, NnrR et un autre qui répond aussi à la microoxie, FixLJ ; tout deux sont localisés dans la même région du plasmide pSymA proche des gènes de dénitrification (Figure 13 a). Il est probable qu'il existe un troisième régulateur puisque certains gènes répondant au NO ne sont sous le contrôle ni de NnrR ni de FixL (Meilhoc *et al.*, 2010). En outre, un système de régulation peut être commun à plusieurs bactéries mais différer en terme de connectivité. Par exemple, *Bradyrhizobium japonicum* dispose aussi des 2 régulateurs de réponse au NO, FixLJ et NnrR mais l'expression de ce dernier est sous le contrôle de FixLJ (Cabrera *et al.*, 2011).

La perception du NO par ces systèmes senseurs va induire la mise en place d'une réponse adaptée comprenant des mécanismes de dégradation/piégeage du NO et des mécanismes de résistance au NO. L'importance de ces mécanismes est capitale aussi bien pour protéger les cellules d'un effet toxique que pour réguler le niveau de NO afin qu'il assure ses fonctions de signalisation.

2) Les mécanismes de piégeage/dégradation du NO

Le glutathion : Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) qui participe au maintien de l'équilibre redox des cellules. Très étudié dans les systèmes eucaryotes, son rôle chez les procaryotes est plus énigmatique. Néanmoins, le glutathion qui est principalement retrouvé chez les bactéries gram négative, intéresse de plus en plus la communauté scientifique (Fahey, 2013). En effet, le glutathion aurait un rôle protecteur contre les oxydants et la voie de synthèse et de signalisation du glutathion sont des cibles intéressantes pour l'identification de nouveaux agents anti-microbiens (Fahey 2013).

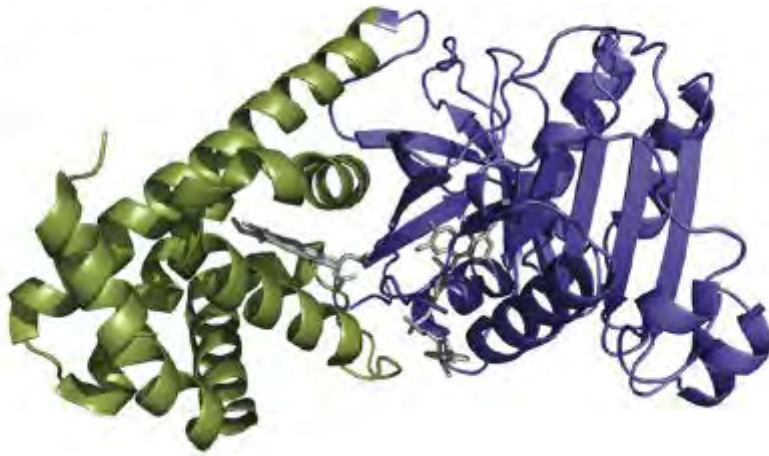


Figure 15: Structure d'une flavohémoglobine

En vert, le domaine globine en N-terminal. En violet, le domaine reductase en C-terminal. Au centre en gris sont représentés l'hème de la protéine et le co-facteur NAD.

Forrester and Foster 2012

Le mode d'action du glutathion repose sur son groupement thiol qui peut lier le NO et d'autres molécules oxydantes comme les espèces réactives de l'oxygène (cf Intro I-4). Ainsi il pourrait servir de piègeur de NO. Cette liaison au NO par une réaction de S-nitrosylation est un mécanisme dynamique puisqu'il existe des GSNO réductases capables de dénitrOSyler le GSNO.

Les hémoglobines: Un autre mécanisme du contrôle du niveau de NO sont les hémoglobines. Ces protéines sont retrouvées dans tous les règnes du vivant. Elles sont principalement connues pour leur activité de transport et de stockage de l'oxygène. Cependant, certaines hémoglobines ont également la capacité de lier le monoxyde de carbone et le NO.

Chez les bactéries, il existe 3 classes d'hémoglobines : les flavohémoglobines codées par le gène *hmp*, les hémoglobines à domaine unique et les hémoglobines tronquées (Bonamore and Boffi, 2008).

Les flavohémoglobines Hmp, des protéines cytoplasmiques, sont le système de dégradation du NO le mieux décrit chez les bactéries. L'expression du gène *hmp* est contrôlée par des régulateurs répondant au NO comme FNR et NsrR. Hmp a été décrit comme un élément majeur du pouvoir pathogène et un important mécanisme de détoxification du NO chez plusieurs bactéries pathogènes telles qu'*E. coli*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*, particulièrement en présence d'oxygène (Stern and Zhu, 2014). Par exemple, HmpX d'*Erwinia chrysanthemi*, une bactérie pathogène de plante, inhibe la mise en place de la HR. D'autre part, l'introduction d'*hmpX* dans une souche avirulente de *Pseudomonas syringae* atténue la HR d'*A. thaliana* et induit la maladie (Boccara *et al.*, 2005). Hmp a aussi été décrite chez des bactéries symbiotiques telles que *S. meliloti* comme étant un déterminant clé dans la résistance au NO en culture (Meilhoc *et al.*, 2010). Chez *S. meliloti* l'expression du gène *hmp* est activée par le système à 2 composants FixLJ via le régulateur intermédiaire FixK.

Pour accomplir son rôle, la flavohémoglobine contient 2 domaines distincts : un domaine globine en N-terminal et un domaine réductase de liaison à la flavine et au NAD en C-terminal (Figure 15). Hmp qui a une plus forte affinité pour le NO que pour l'oxygène lie le NO au niveau de l'hème du domaine globine. Le NO lié va interagir directement avec l'oxygène pour générer du nitrate lors d'une réaction d'oxydation. En absence d'oxygène, le NO lié à l'hème va se dissocier, se dimériser et former de l'oxyde nitreux lors d'une réaction de réduction. Ces réactions sont possibles grâce au transfert d'électron du fer de l'hème au

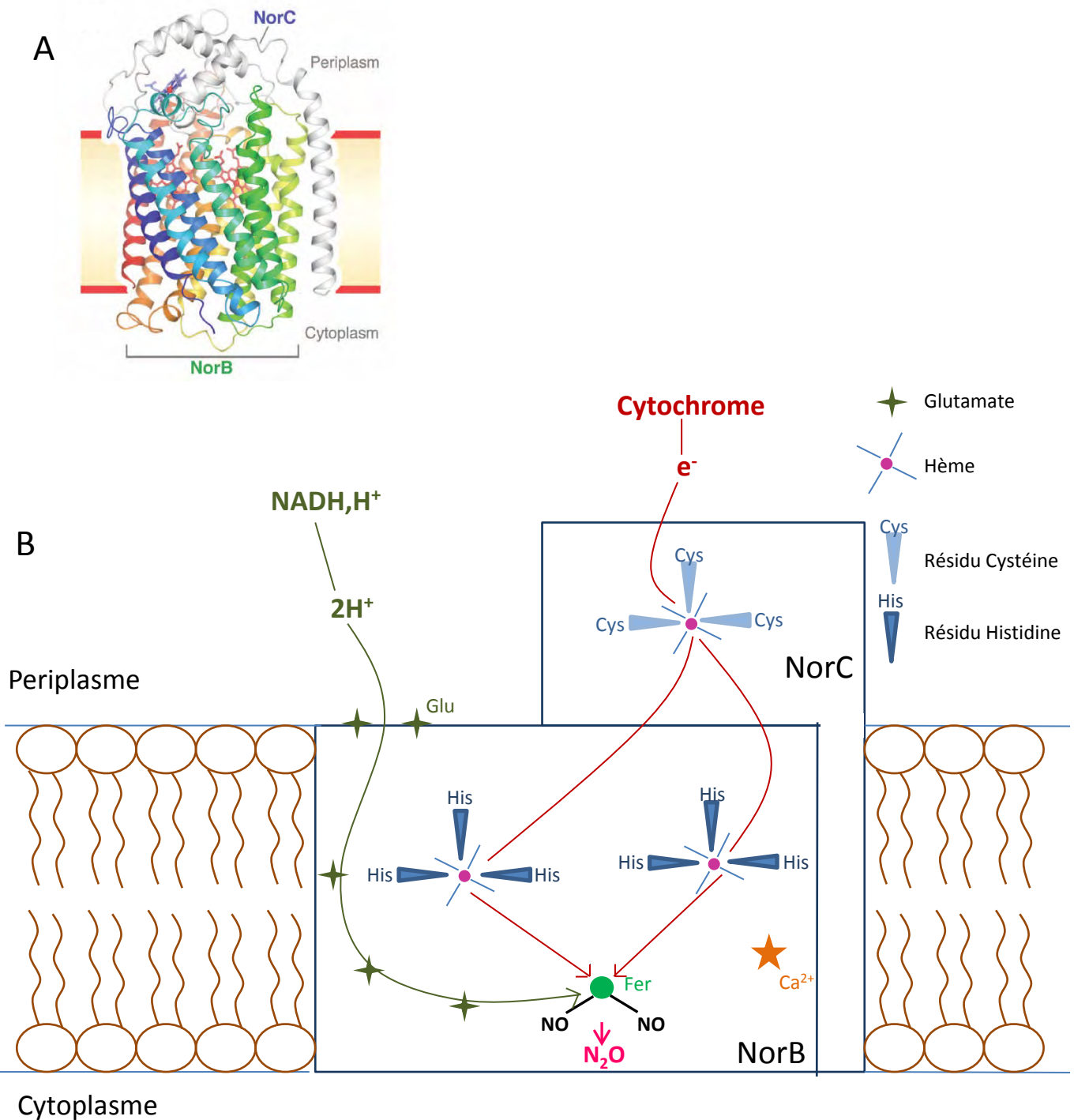


Figure 16: Structure et mode d'action de NorBC.

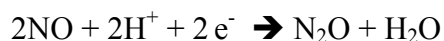
A- Structure du complexe NorBC, d'après Hino *et al.*, 2010

B- Mode d'action de NorBC dans la formation du N₂O. Le site catalytique se trouve au niveau du fer libre de NorB. Les électrons nécessaires pour la réaction sont issus du cytochrome et vont transiter d'hème en hème pour arriver au site catalytique. Les protons sont donnés par le cofacteur NADH, H⁺ et vont rejoindre le site catalytique grâce à un « chemin » de glutamates.

NO. Le fer de l'hème est à nouveau réduit grâce au domaine réductase qui transfère l'électron du NADH au FAD puis au fer (Stern and Zhu, 2014).

Par ailleurs, en plus des flavohémoglobines, les hémoglobines à domaine unique et les hémoglobines tronquées ont aussi un rôle dans le contrôle du niveau de NO. Ces 2 types d'hémoglobines sont dépourvus du domaine réductase et les hémoglobines tronquées ont par ailleurs une version raccourcie du domaine globine (Bonamore and Boffi, 2008). Par exemple, l'hémoglobine à domaine unique Cgb de *Campylobacter jejuni* est importante pour la résistance de la bactérie au NO bien que nous ne connaissions pas le partenaire redox qui réduit le fer de l'hème (Stern and Zhu, 2014). De plus, chez la bactérie symbiotique *Frankia*, un des 2 gènes codant pour une hémoglobine tronquée est induit en réponse au NO suggérant un rôle de cette protéine dans le métabolisme du NO (Niemann and Tisa, 2008).

Les NO réductases: Un autre mécanisme de dégradation du NO fait intervenir les NO réductases. Il existe 2 types de NO réductase chez les procaryotes: des NO réductases cytoplasmiques appelées flavorubrédoxines et le complexe NO réductase de la voie de dénitrification situé dans la membrane. Ces protéines catalysent la réaction de réduction suivante :



Les flavorubrédoxines codées par le gène *norV* sont composées de 2 domaines : un domaine flavinique et un domaine homologue aux protéines rubrédoxines contenant le site catalytique (2 fers libres). *norV* est en opéron avec le gène *norW* qui code pour une oxydoréductase dont le rôle est de transférer les électrons à NorV. Chez *E. coli*, la transcription de *norV* est activée par le senseur NorR et un double mutant *norVW* a une persistance moindre dans les macrophages (Baptista *et al.*, 2012).

Bien que structurellement différentes des flavorubrédoxines, les NO réductases de la voie de dénitrification catalysent aussi la réduction du NO en oxyde nitreux (Shiro, 2012) ; cf Figure 12 : voie de dénitrification). On distingue 3 types de NO réductases (Nor), toutes intégrées dans la membrane cytoplasmique (Shiro, 2012). Le premier type, appelé cNor, est composé de 2 sous-unités, NorB et NorC et le donneur d'électron est le cytochrome c (Figure 16). NorB contient 12 domaines transmembranaires. Le deuxième type appelé qNor contient une seule sous-unité mais l'extrémité N-terminale est proche de la sous-unité NorC des cNor. Leur nom provient du fait que le donneur d'électron n'est pas le cytochrome mais le quinol. Enfin le

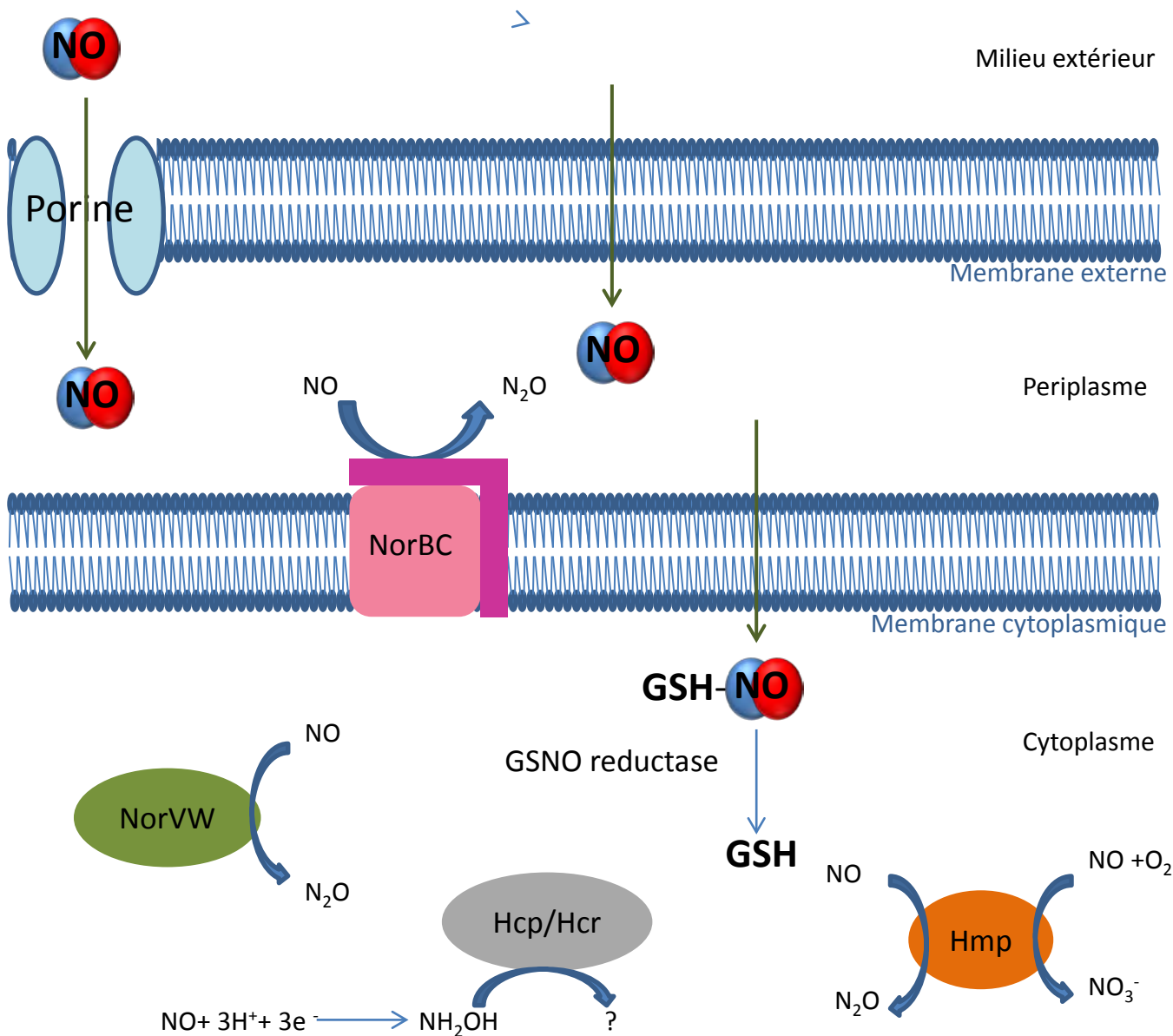


Figure 17: Localisation et fonctionnement des principaux systèmes participant à la dégradation du NO ou de ses dérivés.
D'après Stern and Zhu, 2014

dernier groupe de Nor nommé qCuNor contient 2 sous-unités. C'est la forme de Nor la plus complexe puisqu'elle interagit à la fois avec les cytochromes et les quinols pour récupérer les électrons. Pour les 3 types de Nor, la formation du N₂O se fait par un transfert de protons donnés par le cofacteur NADH, H⁺ qui transitent de glutamate en glutamate et par un transfert d'électrons du cytochrome ou du quinol via les hèmes ; la cible étant les 2 molécules de NO fixées au fer libre (Figure 16, Shiro, 2012 ; Hino *et al.*, 2010). Les 2 hèmes de NorB se logent dans 2 poches histidines et l'hème de NorC se trouve dans une poche de cystéines. Le calcium servirait à maintenir une bonne conformation pour le transport des électrons. Le rôle des Nor dans la détoxification du NO a été mis en évidence chez plusieurs bactéries. Par exemple, l'accumulation de NO dans un mutant *nor* de *Pseudomonas aeruginosa* engendre une désorganisation du biofilm et diminue la viabilité des bactéries (Barraud *et al.*, 2006).

La protéine Hcp: Un mécanisme intéressant, mais peu étudié, de résistance au NO repose sur la protéine Hcp. Cette protéine contient un cluster fer-soufre et, comme NorV, fonctionne avec une oxydoréductase qui réactiverait son site catalytique (Stern and Zhu, 2014). Bien qu'aucun rôle n'ait été caractérisé *in vivo*, il a été suggéré qu'elle participe aussi à la résistance au NO. Il a été proposé que Hcp détoxifie l'hydroxylamine (NH₂OH) qui serait formée lors d'un stress nitrosatif ($\text{NO} + 3\text{H}^+ + 3\text{e}^- \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$). En effet, Hcp purifiée d'*E. coli* et *Rhodobacter sphaeroides* montre une activité hydroxylamine réductase *in vitro* (Stern and Zhu, 2014).

Pour conclure, il existe plusieurs protéines impliquées dans le contrôle du niveau de NO libre dans les cellules (Figure 17). Elles sont localisées dans la membrane cytoplasmique ou dans le cytosol, et les gènes codant pour ses protéines sont induits suite à la perception du NO par des systèmes senseurs.

3) *Les mécanismes de résistance au NO*

Bien que la majorité des gènes identifiés induits par le NO soient impliqués directement dans la dégradation et le piégeage du NO, il existe également des mécanismes de résistance au NO n'agissant pas sur le niveau de NO libre dans la cellule. Un exemple est la protéine YtfE qui a été décrite dans un premier temps comme étant impliquée dans la résistance d'*E. coli* au NO en condition d'anaérobiose (Justino *et al.*, 2005). Ensuite, les mêmes auteurs en 2007 ont montré que l'activité de protéines à cluster fer-soufre telles que la fumarase et l'aconitase est inhibée dans un mutant nul *ytfE* et que cette inhibition est due à des dommages au niveau des

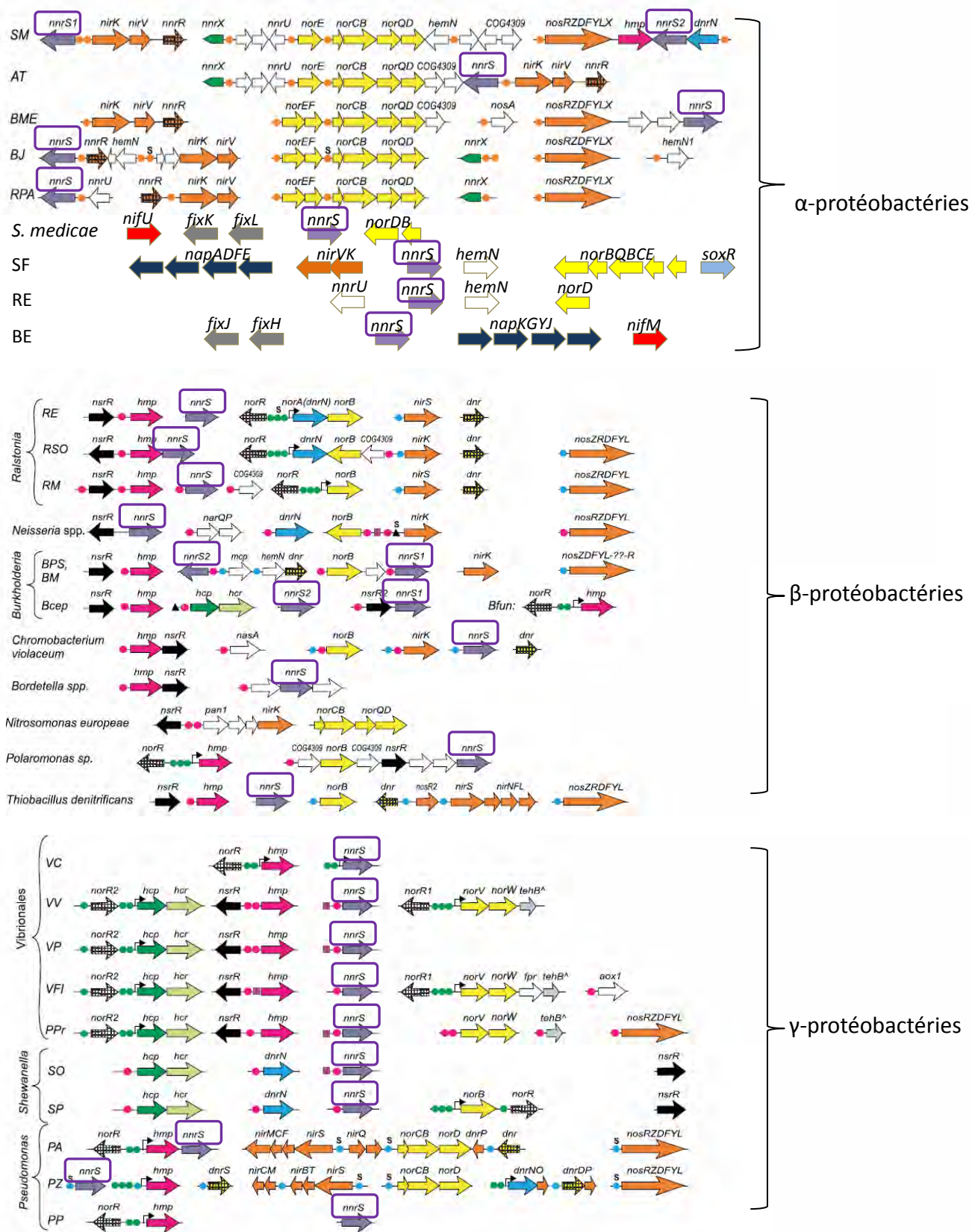


Figure 18: Localisation du gène *nnrS* dans le génome des protéobactéries
 SM: *Sinorhizobium meliloti*; AT: *Agrobacterium tumefaciens*; BME: *Brucella melitensis*;
 BJ: *Bradyrhizobium japonicum*; RPA: *Rhodopseudomonas palustris*; SF: *Sinorhizobium fredii*;
 RE: *Rhizobium etli*; BE: *Bradyrhizobium elkani*
 D'après Rodionov et al, 2005

clusters fer-soufre de ces protéines (Justino *et al.*, 2007). De plus, l'addition de la protéine YtfE purifiée sur des extraits cellulaires mutants restaure l'activité de ces 2 enzymes et rétablit leur cluster fer-soufre. Ce travail a permis de conclure qu'YtfE, dont le gène est régulé par NsrR, est cruciale pour la réparation des clusters fer-soufre en réponse à un stress nitrosatif. YtfE contient 2 fers libres mais son mécanisme d'action reste à ce jour inconnu. Deux homologues de YtfE semblent aussi réparer les clusters fer-soufre endommagés par le NO : DnrN de *Neisseria gonorrhoeae* et ScdA de *Staphylococcus aureus* (Overton *et al.*, 2008). En effet, ScdA est suffisant pour compléter le phénotype d'un mutant *ytfE* d'*E. coli*. De nombreux homologues de la famille DnrN/ScdA ont été retrouvés dans tous les genres bactériens et aussi chez les champignons, suggérant que la réparation des clusters fer-soufre est un mécanisme important et conservé (Overton *et al.*, 2008). Enfin, une autre protéine, nommée NnrS, qui est impliquée dans la résistance au NO de *Vibrio cholerae* agirait aussi en réparant les clusters fer-soufre de protéines (Stern *et al.*, 2013). NnrS a aussi été décrit chez *Neisseria meningitidis* pour être un facteur important dans la colonisation des cellules épithéliales de l'hôte (Jamet *et al.*, 2013). NnrS dont le gène appartient au régulon NorR de *Vibrio cholerae*, est prédite pour être une protéine transmembranaire et contenir un hème et un atome de cuivre (Pei *et al.*, 2014). Cette protéine qui est conservée chez les bactéries (surtout chez les protéobactéries) est souvent retrouvée dans le même locus génomique que les gènes de la dénitrification suggérant un rôle de NnrS dans cette voie (Figure, 18 ; Bartnikas *et al.*, 2002; Rodionov *et al.*, 2005). De plus *nnrS* est localisé à proximité des gènes codant pour d'autres systèmes de dégradation du NO tel que *hmp* (Figure 18). Enfin, certaines bactéries contiennent 2 copies du gène *nnrS* comme *S. meliloti* et *Burkholderia pseudomallei*, *mallei* et *cepacia* (Rodionov *et al.*, 2005).

Comme cela a été vu précédemment, les cytochromes oxydase respiratoires qui sont des enzymes vitales sont inhibées par le NO via une métal-nitrosylation (cf Intro I-4). Chez *Vibrio fischeri*, une bactérie symbiotique du calmar, il a été montré qu'en réponse au NO, le gène *aox* codant pour une oxydase respiratoire alternative est activé via le régulateur NsrR (Dunn *et al.*, 2010). Cette protéine AOX dont le donneur d'électron est la quinone au lieu du cytochrome pour les cytochrome oxydases communes, est résistante au NO ; par conséquent elle permet d'assurer un maintien énergétique de la bactérie en présence de NO et un bon déroulement de l'interaction symbiotique (Dunn *et al.*, 2010). De la même façon, en réponse au NO, *E. coli* induit l'expression d'une quinone oxydase qui est aussi plus résistante au NO que les oxydases respiratoires classiques (Mason *et al.*, 2009).

Enfin, un autre mécanisme d'adaptation des bactéries au NO est l'induction d'un système de dormance qui correspond à un état latent des bactéries (arrêt de la division des bactéries et mise en veille du métabolisme). En effet, par exemple, en réponse au NO synthétisé par les macrophages, la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* va induire l'expression de gènes impliqués dans la mise en place d'un système de dormance tels que les gènes de synthèse du tréhalose, un osmoprotectant ou encore les gènes codant pour des protéines chaperonnes. La régulation de ces gènes fait intervenir un système à 3 composants, DosS, T et R (Voskuil *et al.*, 2003). Dans cet état physiologique de dormance, la bactérie peut survivre des dizaines d'années dans les macrophages et lorsque les conditions deviennent propices, reprendre une division et engendrer la maladie.

En conclusion, les bactéries ont su s'adapter au NO et à ses dérivés. En général, une bactérie possède plusieurs de ces mécanismes qui sont souvent regroupés dans une même région génomique (Figure 18). Cette multiplicité de mécanismes de défense contre le NO suggère une grande importance du contrôle du niveau de NO dans la vie de la bactérie et soulève la question de la redondance fonctionnelle de ces systèmes. A l'heure actuelle, dans la majorité des cas, la mutation perte de fonction d'un gène codant pour un de ces systèmes conduit à un phénotype. Néanmoins, le phénotype d'hypersensibilité d'un mutant *nnrS* chez *Vibrio cholerae* n'est visible que dans un fond génétique *hmp* (Stern *et al.*, 2013).

Ces mécanismes de dégradation/ piégeage et de résistance au NO participent au pouvoir pathogène de certaines bactéries mais ont également un rôle majeur en vie libre. La récente découverte de NO dans les interactions symbiotiques laisse à supposer que les bactéries symbiotiques ont aussi su développer une réponse adaptée au NO.

III) Le NO dans les symbioses légumineuses/rhizobia

Le NO a fait l'objet de multiples études dans les interactions hôte-pathogène et a été caractérisé comme étant une molécule antimicrobienne jouant un rôle majeur dans les mécanismes de défense de l'hôte. Depuis cette dernière décennie, du NO a été détecté lors d'interactions bénéfiques entre 2 partenaires, les symbioses. En effet, du NO est présent lors de l'interaction symbiotique entre le calmar et la bactérie *Vibrio fischeri*, au niveau des lichens (symbiose entre une algue et un champignon), lors du processus de mycorhization (symbiose entre une plante et un champignon) et enfin lors des symbioses fixatrices d'azote entre une plante et une bactérie. Cette découverte soulève 2 questions

principales autour desquelles s'articulent les thématiques de recherche de l'équipe: Quel est le rôle du NO dans ces interactions symbiotiques ? et Comment les partenaires symbiotiques font-ils face au NO ? Dans notre équipe, nous travaillons plus particulièrement sur la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et la bactérie du sol *Sinorhizobium meliloti*.

1) La symbiose fixatrice d'azote M. truncatula/ S. meliloti : notre modèle d'étude

Pour les plantes, trouver une source d'azote est une condition nécessaire à leur croissance. La principale source d'azote consiste en l'ammonium ou les nitrates présents dans le sol, provenant soit d'organismes ayant déjà intégré de l'azote, soit de la fertilisation par des engrais azotés. En outre, certaines plantes, notamment celles de la famille des légumineuses (soja, pois, haricot, luzerne, lotier...) sont capables, via une symbiose avec des bactéries fixatrices d'azote collectivement appelées rhizobia, d'être autonomes pour leurs besoins en azote. C'est le cas de la plante *Medicago truncatula*, qui reçoit l'azote fixé par la bactérie *Sinorhizobium meliloti* lors de l'interaction symbiotique. En contrepartie, la plante fournit à son symbionte des sources de carbone et une niche écologique.

a) Description des 2 partenaires

Medicago truncatula : Le genre *Medicago* qui appartient à la famille des légumineuses est composé de plantes fourragères. L'espèce la plus connue, en particulier pour son importance agronomique est la luzerne ou *Medicago sativa*. Néanmoins, cette plante n'est pas adaptée pour des études génétiques car elle possède un génome tétraploïde de grande taille et est allogame. C'est pour cette raison que *Medicago truncatula*, qui a un petit génome diploïde et qui est autogame a été choisie comme modèle d'étude de la symbiose fixatrice d'azote. Son génome de 500 Mb a récemment été séquencé (Young *et al.*, 2011). En outre, cette légumineuse est facilement cultivable et accomplit un cycle de vie complet sur une période relativement courte.

Sinorhizobium meliloti : *S. meliloti* est une bactérie Gram- qui appartient à la sous-classe α des Protéobactéries. Cette bactérie, présente dans les sols, est capable de vivre soit libre soit en symbiose avec les légumineuses des genres *Medicago*, *Melilotus* ou *Trigonella*. Le génome de la souche de référence Rm 1021 qui est séquencé, est composé d'un chromosome (3,65 Mb) et de deux mégaplasmides pSymA (1,35 Mb) et pSymB (1.68 Mb). Le chromosome porte l'ensemble des gènes de ménage (Capela *et al.*, 2001). Le pSymA contient une grande

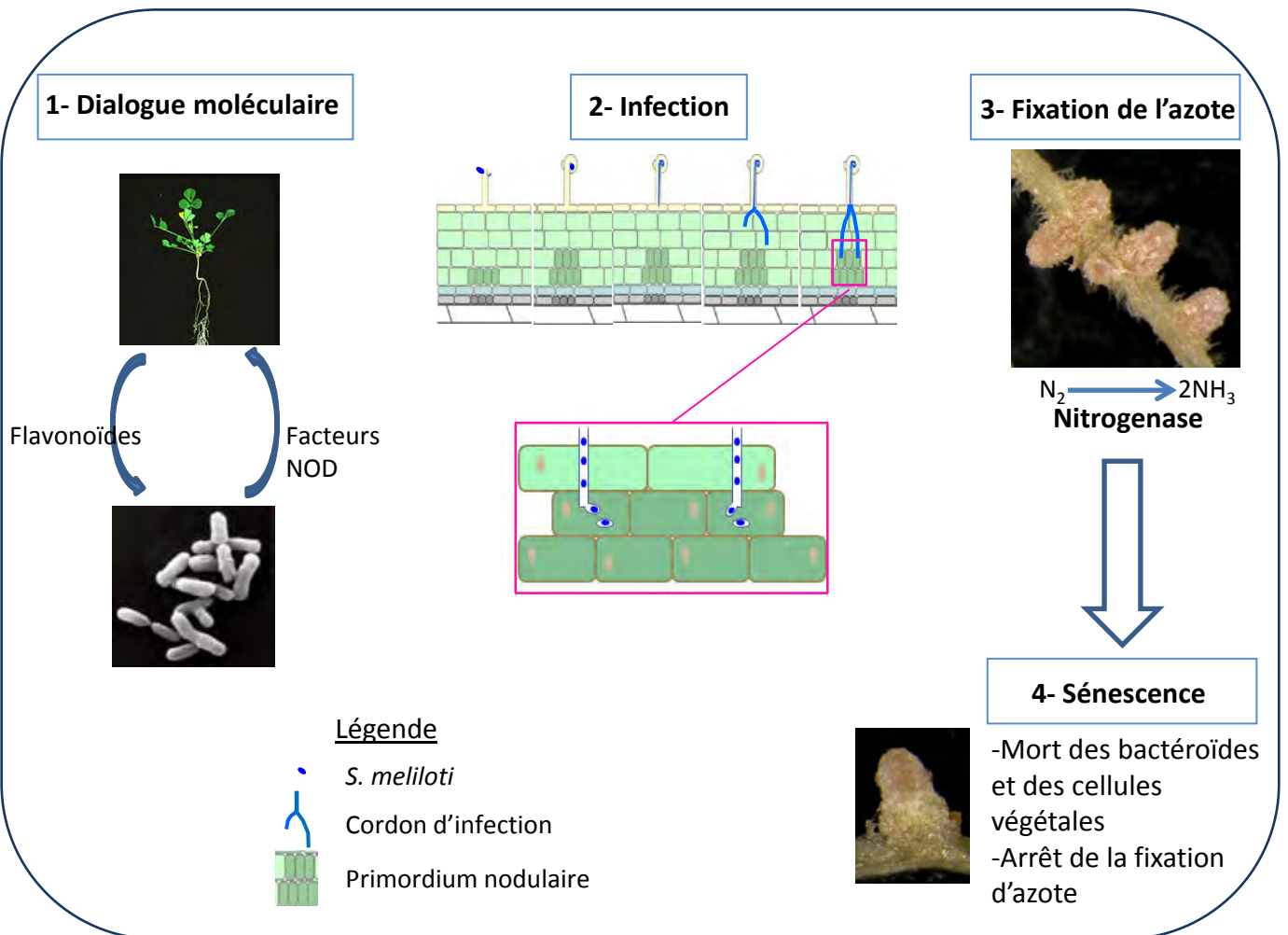


Figure 19 : Les différentes étapes de la symbiose rhizobienne fixatrice d'azote

partie des gènes impliqués dans la symbiose et pSymB porte des gènes codant pour des fonctions de prélèvements de nutriments (transporteurs), d'invasion de la plante (exopolysaccharides) et de réponse aux stress (Barloy-Hubler *et al.*, 2000).

b) La mise en place de l'interaction symbiotique

La symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti* débute par un dialogue moléculaire entre les 2 partenaires (Figure 19). Les légumineuses sécrètent via leurs racines des composés flavonoïdes qui sont perçus par les bactéries. En réponse, *S. meliloti* synthétise des lipochitooligosaccharides appelés facteurs NOD qui sont reconnus par la plante hôte (Jones *et al.*, 2007).

La perception de ces signaux conduit à la mise en place de la symbiose qui est caractérisée par 2 événements se déroulant en parallèle : l'infection de la plante par la bactérie et la reprise de divisions des cellules corticales racinaires aboutissant à la formation d'un nouvel organe, le nodule. La bactérie va venir se fixer au niveau d'un poil racinaire de la plante qui en réponse va s'allonger et se courber de façon à emprisonner la bactérie (Figure 19). La bactérie va se diviser pour former une microcolonie. Pour permettre aux bactéries de pénétrer à l'intérieur de la racine, la paroi végétale est hydrolysée localement et au contact de la microcolonie, la membrane cytoplasmique du poil absorbant va s'invaginer pour former une structure tubulaire, le cordon d'infection. Les bactéries dans le cordon d'infection vont poursuivre leurs divisions. Le cordon d'infection qui peut se ramifier, va croître jusqu'aux cellules corticales qui en parallèle ont repris leur division cellulaire pour former un amas de cellules appelé primordium nodulaire (Figure 19). Cet amas de cellules va grandir pour former un nouvel organe racinaire, le nodule. Par un processus d'endocytose, les bactéries vont être internalisées dans les cellules végétales. Les bactéries appelées bactéroïdes à ce stade se retrouvent donc isolées du cytoplasme, entourées par une membrane d'origine végétale (membrane peri-bactéroïdienne). L'ensemble bactéroïde et membrane péri-bactéroïdienne est appelé symbiosome.

Au sein des symbiosomes, les bactéroïdes vont se différencier en bactéroïdes fixateurs d'azote caractérisés par une endoreduplication du génome, une augmentation de la taille et une perméabilisation de la membrane. La fixation de l'azote par les bactéroïdes est assurée par un complexe enzymatique appelé nitrogénase. Ce complexe est composé de deux sous-unités, la dinitrogénase qui contient le site catalytique et la dinitrogénase réductase qui transfère les électrons à la première sous-unité. La nitrogénase catalyse la réduction d'une

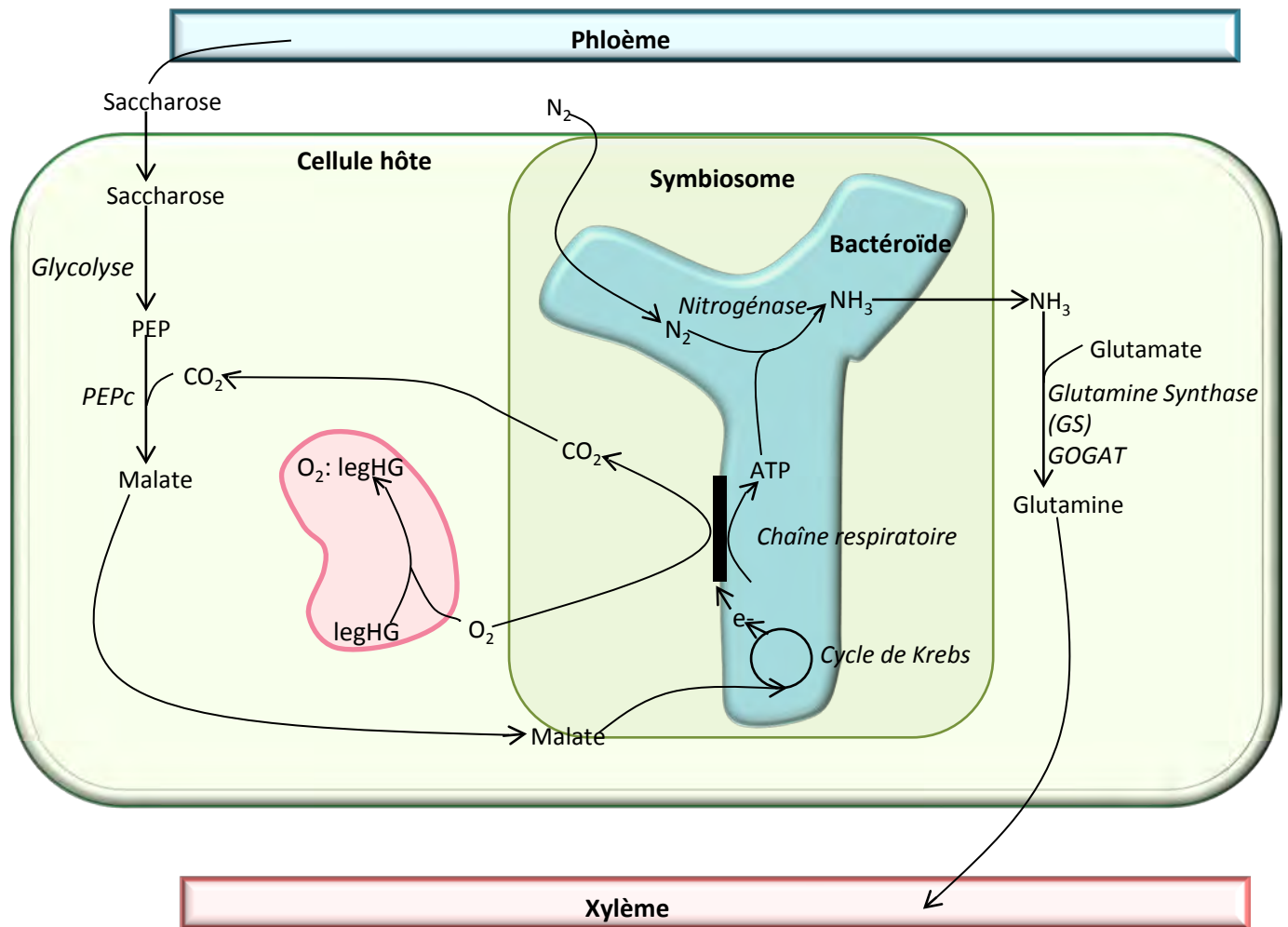
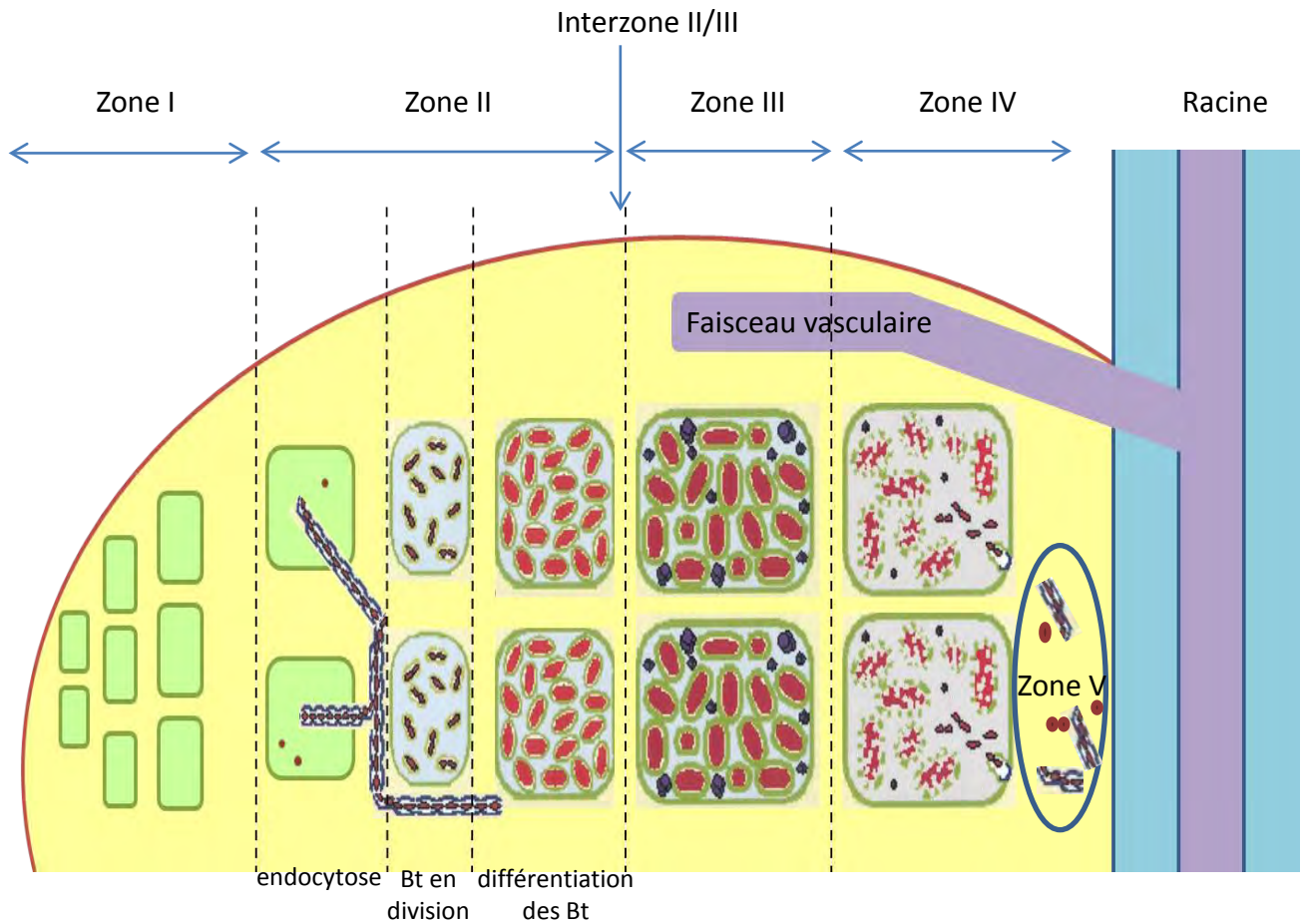


Figure 20: Voies métaboliques lors de la fixation d'azote.

Pour permettre aux bactéroïdes de fixer l'azote, la plante fournit du malate issu de la glycolyse. Le malate va rentrer dans le cycle de Krebs du bactéroïde produisant les électrons et les coenzymes réduits pour la synthèse d'ATP lors de la respiration. L'ATP va être utilisé lors de la fixation de l'azote grâce à la nitrogénase. L'ammoniaque produit va être transporté jusqu'au cytoplasme végétal et être transformé en glutamine grâce au cycle GS-GOGAT. PEP: Phosphoénolpyruvate; PEPc: Phosphoénolpyruvate carboxylase; LegHG: Leghémoglobine.

D'après Oldroyd et al., 2011



endocytose Bt en division différentiation des Bt

Zone V

Faisceau vasculaire

Racine

Figure 21: Organisation schématique d'un nodule de *Medicago truncatula*
 Le nodule est divisé en plusieurs zones, chaque zone correspondant à une étape du développement du nodule. La zone I est la zone méristématique. La zone II correspond à la zone d'infection où les bactéries libérées vont se différencier en bactéroïdes. La zone III est le lieu de la fixation d'azote par les bactéroïdes. A la base du nodule, une zone de sénescence ou zone IV et une zone V dite zone saprophytique peuvent être observées.
 Bt: Bactéroïdes
 D'après la thèse d'Yvan Cam 2012

molécule d'azote atmosphérique (N₂) en deux molécules d'ammoniaque (NH₃) selon la réaction décrite ci-dessus :



Cette réaction est très coûteuse en énergie et donc pour permettre aux bactéroïdes de fixer l'azote, la plante fournit du malate issu de la glycolyse. Ce sucre va rentrer dans le cycle de Krebs du bactéroïde produisant les électrons et les coenzymes réduits pour la synthèse d'ATP lors de la respiration (Figure 20). Une fois l'ammoniaque transporté dans le cytosol végétal, il est assimilé via le cycle GS-GOGAT. Ce processus se compose de deux réactions enzymatiques successives. En présence de glutamate, la glutamine synthétase (GS) va permettre la synthèse de glutamine, un acide aminé majeur qui va être redistribué à la plante entière par les vaisseaux du phloème et être assimilé (Figure 20). Le glutamate sera ensuite régénéré à partir de glutamine et de 2-oxoglutarate grâce à la Glutamine-2-OxoGlutarate-Amino-Transférase (GOGAT).

La nitrogénase est sensible à l'oxygène. Par conséquent un environnement microoxique du nodule est absolument indispensable à son fonctionnement. La mise en place d'une barrière de diffusion de l'oxygène dans le nodule permet de limiter l'entrée de l'oxygène à l'intérieur des symbiosomes. Un deuxième contrôle de la concentration en oxygène provient de la présence d'une protéine végétale très abondante dans le nodule, la leghemoglobine. Cette protéine responsable de la coloration rose des nodules fixe l'oxygène libre et le transporte spécifiquement aux bactéroïdes au niveau de la chaîne respiratoire (Figure 20).

L'environnement microoxique du nodule va permettre l'induction d'un grand nombre de gènes bactériens nécessaire à la mise en place et au maintien de la symbiose (David *et al.*, 1988). La perception de la microoxie est assurée par le système à 2 composants FixLJ qui va induire la transcription de deux régulateurs intermédiaires, NifA et FixK (Figure 14, Bobik *et al.*, 2006). NifA est responsable de l'activation de la transcription des gènes *nifHDKE* codant pour le complexe nitrogénase, et FixK contrôle principalement l'expression de gènes codant pour une oxydase respiratoire alternative hautement affine pour l'oxygène permettant ainsi une respiration efficace malgré les conditions de limitation en oxygène.

Chez *M. truncatula*, à maturité, tous les stades du développement sont visibles dans les nodules (Figure 21). Ceci est dû à la présence d'un méristème apical persistant ou zone I qui

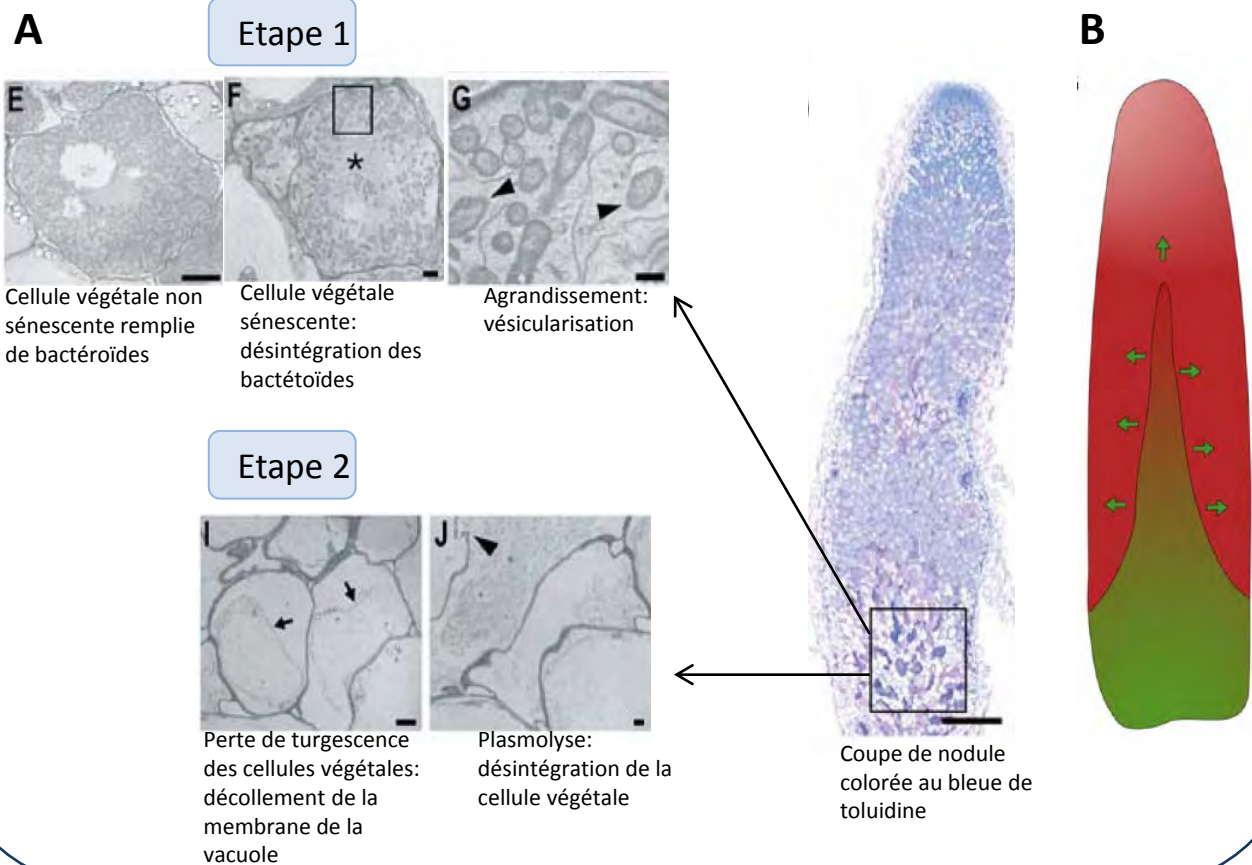


Figure 22: Analyse cytologique de la sénescence des nodules de *M. truncatula*

A- l'analyse de l'ultrastructure de la sénescence en microscopie électronique a révélé 2 étapes. La première correspond à la désintégration des bactéroïdes caractérisée par de nombreuses vésicules dans le cytosol végétal et la deuxième étape est la dégradation des cellules végétales initiée par une perte de turgescence des cellules et un décollement de la membrane de la vacuole B- schéma de la progression conique de la sénescence.

D'après Van de Velde et al., 2006; Perez Guerra et al., 2010

produit en continu des cellules végétales par division cellulaire. Ainsi, la zone méristématique est suivie de la zone d'infection (zone II) où les bactéries véhiculées par les cordons d'infection se différencient en bactéroïdes. La zone III correspond à la fixation de l'azote par les bactéroïdes et enfin à la base du nodule une zone de sénescence ou zone IV peut être observée. Il existe aussi une zone V, dite zone saprophytique, où des bactéries non différenciées sont libérées des cordons d'infection dégradés lors de la sénescence. Après leur libération des cordons, les bactéries se multiplient dans les débris cellulaires du nodule avant de retourner dans le sol (Timmers *et al.*, 2000). Ces nodules sont dits de type indéterminé. A l'inverse, il existe des nodules de type déterminé qui se développent à partir d'un méristème central qui n'a qu'une activité transitoire. Par conséquent, la croissance du nodule est due à une augmentation de la taille des cellules végétales et non pas aux divisions cellulaires. Le type de nodule est conditionné par la légumineuse hôte ; les nodules de type indéterminé sont formés par les espèces issues de milieux tempérés comme la luzerne, le pois ou le trèfle tandis que les nodules de type déterminé sont formés par les légumineuses tropicales telles que le soja, le haricot ou le lotier.

c) *La sénescence des nodules*

La quatrième étape du processus développemental du nodule est la sénescence (Figure 19). La sénescence qui débute à la base du nodule (Zone IV), se caractérise par la mort à la fois des cellules végétales et des bactéroïdes et par conséquent l'arrêt de la fixation de l'azote (Dupont *et al.*, 2012). Au niveau macroscopique, la sénescence se visualise par l'apparition d'une coloration verte à la base du nodule qui est potentiellement due à la nitration de la leghémoglobine (Navascués *et al.*, 2012 ; Sainz *et al.*, 2015).

L'analyse cytologique de la sénescence des nodules de *M. truncatula* a mis en évidence deux étapes successives : la première étape est la désintégration des bactéroïdes et des symbiosomes caractérisée par la présence de nombreuses vésicules dans le cytoplasme des cellules végétales et ensuite, la deuxième étape, est la dégradation des cellules végétales initiée par la perte de turgescence des vacuoles (Figure 22 A ; Pérez Guerra *et al.*, 2010, Van de Velde *et al.*, 2006). En outre, la sénescence aurait une progression conique, ce qui favoriserait la remobilisation des nutriments puisque les dernières cellules viables se trouvent à proximité du système vasculaire (Figure 22 B, Perez Guerra *et al.*, 2010).

L'étude du transcriptome de la sénescence des nodules de *M. truncatula*, a montré une forte induction de gènes liés à la réponse au stress ainsi que l'induction de gènes de défense

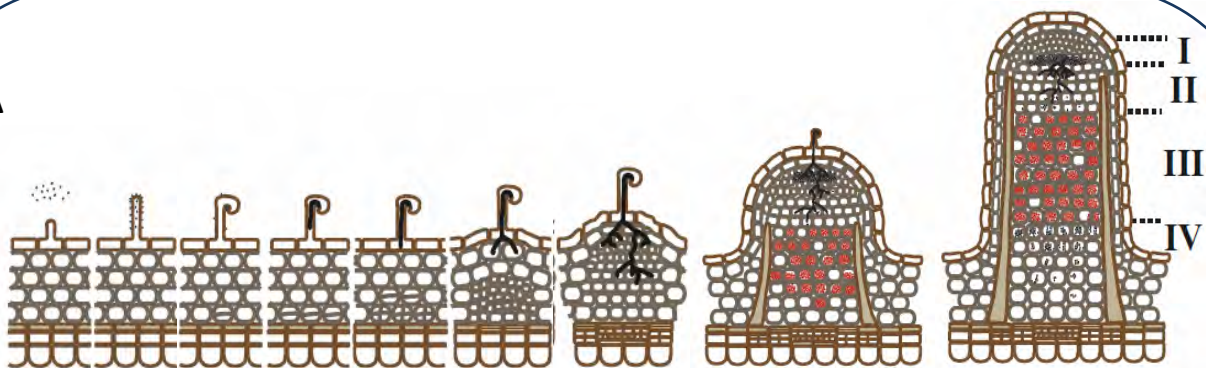
(Van de Velde *et al.*, 2006). Par ailleurs, cette analyse suggère un rôle important et antagoniste de certaines phytohormones dans le processus de sénescence. L'éthylène et l'acide jasmonique activeraient la sénescence alors que les gibbérellines la supprimeraient. Enfin, cette étude a mis en évidence l'induction de plusieurs systèmes de dégradation de protéines tels que des composants du protéasome et des cystéines protéases. Récemment, Pierre et ses collaborateurs ont montré que deux cystéines protéases de *M. truncatula*, MtCP6 et MtVPE, participent à la mise en place de la sénescence des nodules. En effet, des lignées RNAi de ces deux protéinases forment des nodules qui présentent une sénescence retardée et par conséquent fixent plus longtemps l'azote (Pierre *et al.*, 2014). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que les systèmes antioxydants participeraient aussi au processus de sénescence. En effet, les ROS s'accumulent au niveau de la zone de sénescence et un double mutant des gènes codant pour les catalases (enzymes qui détoxifient les ROS) *katA katB* de *S. meliloti* conduit à une sénescence précoce des nodules (Puppo *et al.*, 2005; Dupont *et al.*, 2012). En outre, la mutation dans le gène *gshB* de *S. meliloti* qui code pour une synthétase du glutathion, un puissant anti-oxydant provoque aussi une sénescence précoce des nodules et le contenu en glutathion diminuerait avec l'âge du nodule (Puppo *et al.*, 2005, Dupont *et al.*, 2012).

Le processus de sénescence des nodules peut être accéléré en fonction des conditions environnementales. En effet, la présence de nitrate dans le sol ou un stress abiotique (température, hypoxie, obscurité) ou biotique (pathogènes) peuvent conduire à une sénescence précoce et accélérée des nodules (Dupont *et al.*, 2012). On parle alors de sénescence induite, à différencier de la sénescence développementale dont le déroulement présente des caractéristiques différentes. En effet, sur 58 gènes induits lors de la sénescence développementale, 28 ne sont pas activés lors de la sénescence induite par l'obscurité (Perez Guerra *et al.*, 2010). De plus, d'un point de vue cytologique, la progression de la sénescence semble également différente. En effet, le front de sénescence serait plat (au lieu d'un cône pour la sénescence développementale) et se développerait très rapidement en quelques jours.

Pour la plante, le déclenchement de la sénescence des nodules pourrait avoir un intérêt biologique dans le remplissage des graines. En effet, la fixation d'azote par les nodules étant coûteuse en énergie, la plante déclencherait la sénescence des nodules afin de réorienter le flux de carbone vers les graines.

2) Du NO est détecté à toutes les étapes de la symbiose *Medicago/ S. meliloti*

A



B

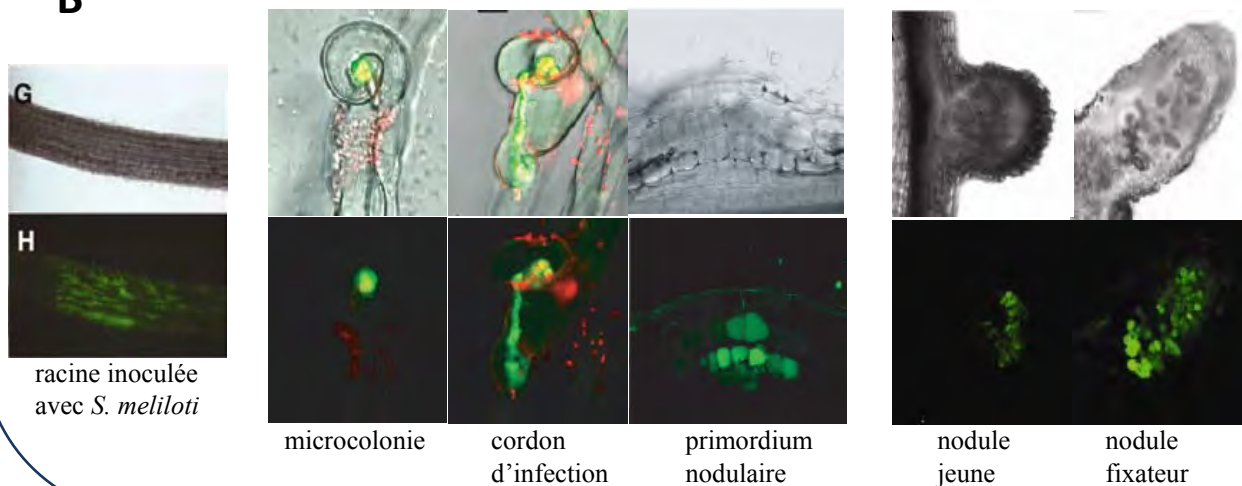


Figure 23: Détection du NO à toutes les étapes de la symbiose *Medicago/S. meliloti*

A- Représentation schématique des différentes étapes de la symbiose. D'après Saeki et al, 2011

B- Détection du NO aux différentes étapes de la symbiose en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO, DAF-2DA. D'après Nagata et al, 2008, del Giudice et al, 2011; Baudouin et al, 2006.

La première mise en évidence du NO dans les nodules symbiotiques a été indirecte et date de 1977. Dans cette étude, les auteurs ont montré par résonance magnétique que la leghémoglobine issue des nodules de soja peut être sous une forme nitrosylée, suggérant la présence de NO dans ces nodules (Maskall *et al.*, 1977). En 1998, la détection de nitrosylleghémoglobines (LbNO) dans les nodules de soja a été confirmée et elles ont été principalement détectées dans les nodules jeunes (Mathieu *et al.*, 1998). Les auteurs ont proposé un lien entre l'abondance des LbNO et le développement et fonctionnement du nodule.

Depuis, plusieurs études ont démontré la production de NO dans d'autres symbioses rhizobium/ légumineuses. Lors de l'interaction symbiotique entre le lotier et la bactérie *Mesorhizobium loti*, du NO est produit à la surface de la racine quelques heures après inoculation (Nagata *et al.*, 2008). Cette synthèse précoce du NO par la plante est symbionte-spécifique, et transitoire. De façon intéressante, l'inoculation de racines de lotier avec des bactéries pathogènes telles que *Ralstonia solanacearum* ou *Pseudomonas syringae* conduit aussi à une production de NO dans les racines mais cette production est continue (Nagata *et al.*, 2008). De plus, plus tardivement dans le processus symbiotique, du NO a aussi été détecté dans les nodules matures du lotier (Shimoda *et al.*, 2009).

Lors de la symbiose entre *S. meliloti*/ *Medicago*, du NO a été détecté à toutes les étapes du processus symbiotique (Figure 23). L'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique du NO la DAF-2DA, a permis de mettre en évidence la présence de NO à la surface des racines de *Medicago* quelques heures après inoculation avec son symbionte (Nagata *et al.*, 2008). En outre, en 2011, del Giudice et ses collaborateurs ont détecté du NO au niveau de la microcolonie, le long du cordon d'infection et dans les primordia nodulaires (del Giudice *et al.*, 2011). Du NO a aussi été détecté dans les phases plus tardives de la symbiose. La première observation directe de la présence de NO dans des nodules matures a été réalisée par Baudouin *et al.*, en 2006. A l'aide de la DAF-2DA, les auteurs ont observé en microscopie confocale la formation de NO dans des nodules de 10, 20 et 30 jours. Les auteurs ont également indiqué que le NO est localisé au niveau de la zone de fixation (zone III) dans les cellules infectées, suggérant que la présence des bactéroïdes est nécessaire, directement ou indirectement à la production de NO (Baudouin *et al.*, 2006).

Enfin, la production de NO au cours de la symbiose légumineuse/rhizobia a été également détectée après exposition des nodules à un stress hypoxique. En effet, en condition de carence

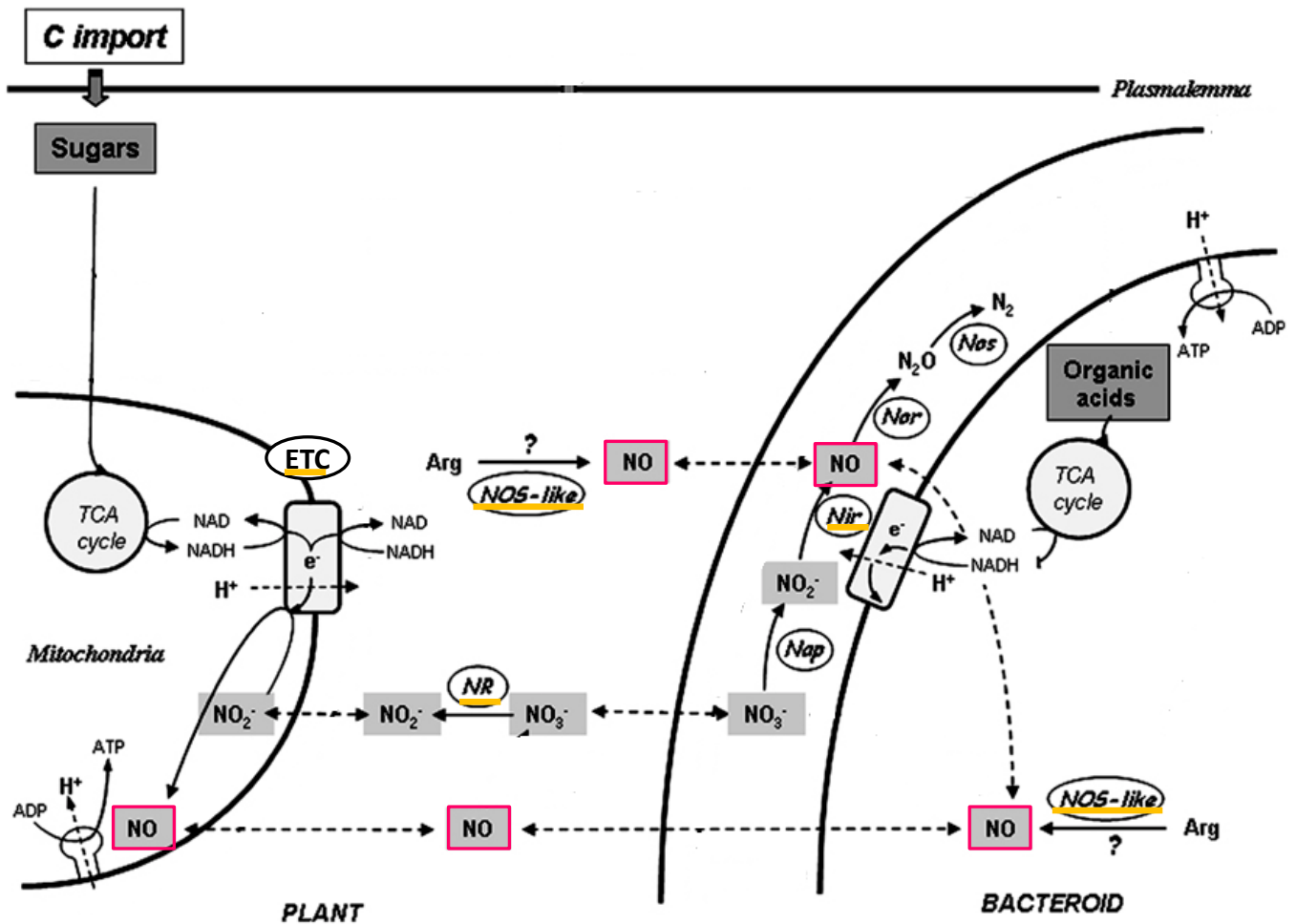


Figure 24: Représentation schématique des sources de NO dans les symbioses fixatrices d'azote

Du côté de la plante, le NO est produit via 2 réactions successives: la réduction des nitrates en nitrite par les NR puis la réduction des nitrites en NO par la chaîne de transporteurs des électrons (ETC). La synthèse du NO par une hypothétique NOS-like est envisagée.

Du côté de la bactérie, le NO est produit par la voie de dénitrification qui implique des nitrates reductases (Nap), nitrite reductases (Nir), NO reductase (Nor) et oxyde nitreux reductase (Nos). La production du NO par une NOS-like est hypothétique.

Chez les deux partenaires, l'ATP est synthétisé grâce à un gradient électrochimique généré par les protons. Ces protons sont pompés par l'ETC.

D'après Boscari et al, 2013

en oxygène, Horchani et ses collaborateurs ont observé une augmentation de la production de NO dans les nodules de *M. truncatula* (Horchani *et al.*, 2011). De la même façon, des nodules de soja en condition de stress de submersion montrent une augmentation de la quantité de NO détectée en dosant la LbNO (Sánchez *et al.*, 2010).

La découverte du NO à toutes les étapes de la symbiose fixatrice d'azote soulève la question de sa synthèse et du contrôle de sa quantité.

3) La modulation du niveau de NO dans les nodules symbiotiques

La particularité de la symbiose est la formation de nodules contenant à la fois des cellules végétales et des bactéries. Par conséquent la présence de NO dans les nodules peut être d'origine végétale et/ ou bactérienne. Ainsi, plusieurs mécanismes de synthèse de NO ont été décrits dans les symbioses fixatrices d'azote et notamment dans notre modèle d'étude *M. truncatula*/ *S. meliloti* (Figure 24).

a) Systèmes de synthèse du NO dans les nodules

Certaines études suggèrent l'implication d'une NO synthétase-like dans la production de NO dans les symbioses fixatrices d'azote. Comme mentionné précédemment (Cf Intro I-2), cette enzyme catalyse la synthèse de NO et de L-citrulline à partir de l'arginine. Dans des extraits de nodules de *Lupinus albus*, il a été montré que du NO et de la L-citrulline sont produits de manière dépendante de l'arginine et que l'application d'un inhibiteur des NOS de mammifères inhibe la production de L-citrulline (Cueto *et al.*, 1996). Plus récemment, Keyster et ses collaborateurs ont montré qu'un inhibiteur de NO synthétase réduit le niveau de NO dans les nodules de soja (Keyster *et al.*, 2010). De plus, en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO, Baudouin et ses collaborateurs ont mis en évidence une diminution de la détection de NO *in situ* dans des coupes de nodules de *Medicago truncatula* traitées avec un inhibiteur de NOS suggérant que le NO dans les nodules matures est synthétisé au moins en partie par une NOS-like (Keyster *et al.*, 2010; Baudouin *et al.*, 2006). Cependant, à l'heure actuelle, l'identité moléculaire de ces NOS-like reste méconnue. Par ailleurs, Pauly et ses collaborateurs ont testé si un orthologue de AtNOA1, MtNOA1 est responsable de la synthèse de NO dans les nodules de *M. truncatula* (Pauly *et al.*, 2011). Initialement décrit pour être une NO synthétase chez *A. thaliana*, des études ont montré qu'AtNOA1 ne possède pas d'activité NOS bien qu'elle participe au contrôle du niveau de NO dans les tissus d'*A. thaliana* (Guo *et al.*, 2003). Il a été montré que MtNOA1 participe à la

synthèse de NO dans les racines mais pas dans les nodules de *M. truncatula* (Pauly *et al.*, 2011).

En utilisant une approche génétique couplée à des méthodes pharmacologiques, Horchani et ses collaborateurs ont étudié le rôle des nitrate réductases (NR) de plante et de la chaîne de transporteurs des électrons (ETC) dans la production de NO dans les nodules de *M. truncatula* (Horchani *et al.*, 2011). La synthèse de NO dans ces nodules est inhibée par le tungstate (Tg), un inhibiteur des nitrate réductases. De plus, les nodules issus de plantes mutées dans les 2 gènes codant pour les NR (MtNR1/2) montrent une diminution du niveau de NO par rapport à des nodules sauvages. La réduction de la production de NO en présence de Tg et le double mutant *NR1 NR2* sont complétés par l'addition de nitrite en *trans* suggérant que la synthèse du NO dépend de l'activité des NR mais que les NR ne produisent pas directement le NO. En outre, l'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne de transporteurs des électrons mitochondriale réduit fortement la production de NO, indiquant que l'ETC est le lieu de la réduction des nitrites en NO. Par conséquent, dans les nodules de *M. truncatula*, la synthèse de NO ferait intervenir deux étapes successives : tout d'abord la réduction des nitrates en nitrites par les NR et ensuite la réduction des nitrites en NO par l'ETC.

Chez les rhizobia, la voie de dénitrification (Cf Figure 12) est dépendante des gènes *nap*, *nir*, *nor* et *nos* qui codent respectivement des NR, nitrite réductase (NiR), NO réductase et N₂O réductase. Dans les nodules de soja, en utilisant des mutants *nap* et *nir* de *Bradyrhizobium japonicum*, il a été montré que la voie de dénitrification contribue pour la majeure partie à la production de NO dans les nodules, particulièrement en conditions d'hypoxie (Meakin *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2010). En utilisant aussi une approche génétique, Horchani et ses collaborateurs, ont montré qu'environ 1/3 du NO généré dans les nodules de *M. truncatula* provient de la voie de dénitrification de *S. meliloti* (Horchani *et al.*, 2011).

b) Systèmes de piégeage/ dégradation du NO dans les nodules

Le niveau de NO libre subcellulaire est un équilibre entre sa synthèse et sa dégradation/piégeage. Quelques études ont mis en évidence le rôle d'hémoprotéines dans la dégradation et/ou le piégeage de NO dans les nodules symbiotiques. Parmi ces hémoprotéines, on distingue les hémoglobines de plantes qui sont divisées en 3 sous-classes comme vu précédemment (cf Intro I-4) : les hémoglobines symbiotiques ou leghémoglobines que l'on retrouve spécifiquement dans les nodules fixateurs d'azote, les hémoglobines non

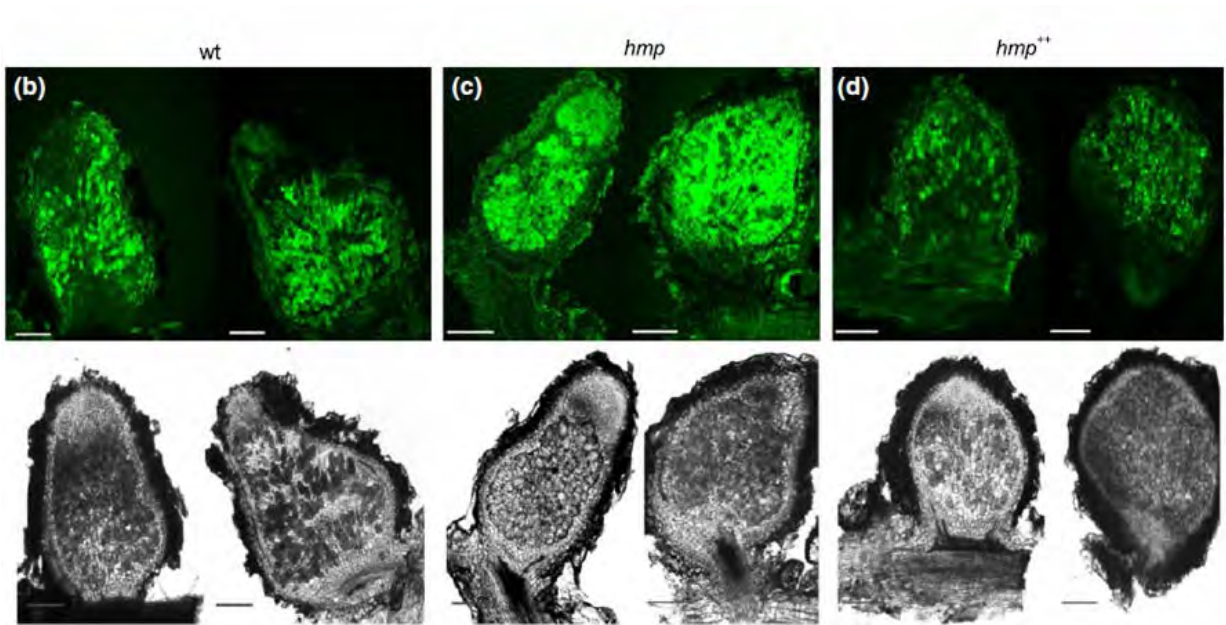


Figure 25: La flavohémoglobine de *S. meliloti* participe à la dégradation du NO dans les nodules de *M. truncatula*. Des coupes de nodules induits soit par la souche sauvage (wt) soit par le mutant perte de fonction Hmp (*hmp*) soit par la souche surexpresser Hmp (*hmp*⁺⁺) ont été traitées avec la sonde fluorescente spécifique du NO, DAF-2DA. D'après Cam et al, 2012

symbiotiques communes à toutes les plantes, et les hémoglobines tronquées (Gupta *et al.*, 2011). Ces 3 groupes, dont le site catalytique est un hème capable de lier différents ligands tels que l'oxygène, le monoxyde de carbone ou encore le NO, diffèrent en fonction de leurs motifs structuraux et de leur affinité de liaison aux ligands (Gupta *et al.*, 2011). La leghémoglobine qui atteint une concentration de l'ordre du millimolaire dans les cellules végétales infectées par les bactéroïdes, a pour rôle de lier l'oxygène libre au niveau de l'hème et de le transporter au site de la respiration permettant ainsi un maintien énergétique suffisant tout en évitant l'inactivation de la nitrogénase par l'oxygène (Ott *et al.*, 2005). Il a été montré, dans les nodules de soja, que la leghémoglobine est capable de lier le NO avec une haute affinité au niveau de son hème et il a été proposé que cette protéine soit un piègeur de NO (Herold and Puppo, 2005). De façon similaire, les hémoglobines non symbiotiques lieraient aussi le NO et le transformeraient en nitrate en condition de carence en oxygène et dans les nodules symbiotiques (Igamberdiev and Hill, 2004). En effet, la surexpression de ns-HB1, une hémoglobine non symbiotique du lotier, diminue le niveau de NO dans les nodules et améliore la fixation d'azote (Shimoda *et al.*, 2009). Enfin, bien qu'aucun rôle direct dans le piégeage et/ ou la dégradation de NO n'ait été mis en évidence pour les hémoglobines tronquées végétales, il a été montré que deux gènes de *M. truncatula* codant pour deux hémoglobines tronquées sont induits dans les nodules racinaires suggérant un rôle potentiel de ces protéines dans le contrôle du niveau de NO (Vieweg *et al.*, 2005).

En outre, du côté bactérien, il a été montré que la flavohémoglobine Hmp (Cf Intro II-2) de *S. meliloti* participe à la dégradation du NO dans les nodules de *M. truncatula*. En effet, une mutation perte de fonction dans le gène codant pour Hmp (noté *hmp*) conduit à une augmentation du niveau de NO dans les nodules quantifiée en utilisant une sonde spécifique du NO, DAF-2DA (Figure 25, Cam *et al.*, 2012). A l'inverse, la surexpression d'*hmp* conduit à une diminution de la concentration en NO dans les nodules.

En plus des hémoglobines, les NO réductases NOR (Cf Intro II-2) de certaines rhizobia participeraient à la dégradation du NO dans les nodules symbiotiques. En effet, Sánchez et ses collaborateurs ont montré qu'en conditions de carence en oxygène, les nodules de soja induits par un mutant perte de fonction *norC* contiennent plus de NO et de nitrosyleghémoglobines que les nodules induits par la souche sauvage (Sánchez *et al.*, 2010). De plus, le niveau de NO est augmenté dans les nodules de haricots induits par un mutant *norC* de *Rhizobium etli* par rapport à des nodules sauvages (Gómez-Hernández *et al.*, 2011).

4) Rôles du NO dans les nodules symbiotiques et importance de la réponse bactérienne au NO pour le maintien de la symbiose

La détection du NO aux différents stades de la symbiose *S. meliloti*/ *M. truncatula* et la mise en évidence de systèmes de contrôle du niveau de NO, soulèvent la question du rôle du NO à ces différentes étapes. A l'heure actuelle, seulement quelques publications ont décrit le rôle potentiel du NO dans la symbiose fixatrice d'azote.

Le premier effet du NO sur la symbiose fixatrice d'azote a été constaté en 1982 par Trinchant et Rigaud. Dans cette étude, les auteurs ont montré, *in vitro*, que la nitrogénase purifiée à partir de *Bradyrhizobium japonicum* est inhibée par le NO (Trinchant and Rigaud, 1982). Plus récemment, il a été montré que l'addition d'un donneur de NO sur des nodules de lotier conduit à une diminution de l'efficacité de fixation d'azote. En revanche, l'application d'un piègeur de NO supprime l'inhibition de la fixation de d'azote médiée par le nitrate (Kato *et al.*, 2010). De plus, l'effet inhibiteur du NO sur la nitrogénase a été confirmé indirectement par Shimoda et ses collaborateurs qui ont montré que la surexpression d'une hémoglobine non symbiotique du lotier (une protéine qui dégrade le NO) conduit à une augmentation de la fixation (Shimoda *et al.*, 2009). Le mode d'action du NO dans l'inhibition de la nitrogénase reste à élucider. Cependant plusieurs hypothèses sont émises. Tout d'abord, le NO pourrait inhiber l'activité de cette enzyme par S-nitrosylation. En effet, la nitrogénase possède au moins 3 sites de S-nitrosylation potentiels (Xue *et al.*, 2010) et, de façon intéressante, des sous-unités de la nitrogénase ont été identifiées parmi les protéines S-nitrosylées dans des nodules matures de *M. truncatula* (Puppo *et al.*, 2013). Une autre hypothèse serait que le NO entre en compétition avec l'oxygène pour la fixation à la leghémoglobine. Par conséquent, une augmentation de nitrosyl-leghémoglobine conduirait à une élévation du niveau d'oxygène libre, un puissant inhibiteur de la nitrogénase (Trinchant and Rigaud, 1982 ; Kato *et al.*, 2010).

Une autre enzyme essentielle à la symbiose inhibée par le NO est la glutamine synthétase (GS) végétale (Melo *et al.*, 2011). La GS, qui permet l'assimilation de l'azote, catalyse la réaction entre l'ammonium et le glutamate pour former la glutamine, un acide aminé précurseur de tous les composés azotés (Figure 20). Les auteurs ont montré *in vitro*, que la GS de *M. truncatula* est nitrée au niveau de la tyrosine 167 et que cette nitration inhibe l'activité de cette enzyme. *In vivo*, l'addition d'un donneur de NO sur les nodules entraîne une

augmentation de la nitration de la GS corrélée à une diminution de son activité. L'inhibition de cette enzyme par tyrosine nitration pourrait stimuler les mécanismes anti-oxydants du nodule puisque le glutamate, le substrat de la GS, est aussi un précurseur de la formation du glutathion (GSH), un puissant anti-oxydant (Silva and Carvalho, 2013).

Le NO n'a pas qu'un rôle inhibiteur et délétère pour l'interaction symbiotique. En 2011, del Giudice et ses collaborateurs ont montré que le NO est requis pour l'établissement de la symbiose *M. truncatula*/ *S. meliloti* (del Giudice *et al.*, 2011). En effet, la déplétion de NO par l'utilisation d'un piègeur conduit à un retard dans l'apparition des nodules. De plus, une souche de *S. meliloti* qui surexprime Hmp, une enzyme qui dégrade le NO est moins compétitive qu'une souche sauvage dans la formation des nodules. Par conséquent, le NO jouerait un rôle positif dans les étapes précoces de la symbiose et assurerait deux fonctions. La première serait une fonction de répression des réactions de défense de la plante suite à la perception de la bactérie symbiotique. Cette idée provient d'une étude transcriptomique réalisée sur *M. truncatula* traitée avec son symbionte, où l'application d'un piègeur de NO active la transcription de gènes de défense de la plante (Boscari *et al.*, 2013). Le NO aurait aussi une fonction dans l'organogénèse du nodule chez *M. truncatula* et *M. sativa*, probablement en tant que messenger secondaire en aval de la voie de signalisation de l'auxine (Pii *et al.*, 2007). Pour montrer cela, les auteurs ont surexprimé les gènes de synthèse de l'auxine dans une souche de *S. meliloti*. Cette surexpression, par rapport à des racines inoculées par une souche sauvage, entraîne une augmentation du nombre de nodules de l'ordre de 50 %. De manière intéressante, les nodules induits par la souche surproduisant l'auxine, présentent une augmentation de la quantité de NO par rapport à des nodules sauvages. En revanche, une diminution du NO en traitant les plantes avec un piègeur de NO, provoque une diminution du nombre de nodules. Enfin, bien qu'aucune expérience ne le montre, il a été suggéré que le NO antagonise le burst oxydatif mis en place précocement par la plante lors de la détection de son symbiote. C'est le cas lors de l'interaction symbiotique entre le champignon et le lichen, où le NO synthétisé par le symbionte a un rôle important dans la régulation du stress oxydatif du lichen (Catalá *et al.*, 2010).

Récemment, en 2012, les travaux d'Yvan Cam dans notre équipe ont suggéré que le NO soit un signal local de l'induction de la sénescence des nodules de *M. truncatula* (Cam *et al.*, 2012). En effet, une augmentation du niveau de NO dans les nodules conduit à une sénescence précoce des nodules et inversement, une diminution de la concentration de NO provoque un retard de la sénescence. Cette étude met aussi en lumière pour la première fois,

le rôle primordial de la réponse de *S. meliloti* au NO dans le maintien de l'interaction symbiotique. En effet, l'augmentation de la concentration en NO nodulaire à l'origine du phénotype de sénescence précoce des nodules est provoquée par la mutation perte de fonction du gène *hmp* et inversement, une diminution du niveau de NO à l'origine du retard dans l'apparition de la sénescence des nodules résulte de la surproduction de Hmp (Figure 25). Cette protéine qui a une fonction de dégradation du NO, fait partie du régulon de réponse au NO et la transcription du gène *hmp* est sous le contrôle du senseur de NO FixLJ via l'intermédiaire FixK (Figure 14). Chez *Bradyrhizobium japonicum* et *Rhizobium etli*, il a aussi été montré que la réponse bactérienne au NO est importante dans le contrôle du niveau de NO dans les nodules de soja et de haricots respectivement. En effet, chez ces deux bactéries, en présence de nitrate, la mutation perte de fonction de *norC*, un gène dont l'expression est induite par FixL (absence de FixJ chez *Rhizobium etli*), provoque une augmentation du niveau de NO dans les nodules, détectée en dosant les nitrosylhémoglobines (Gomez-Hernandez *et al.*, 2011 ; Sanchez *et al.*, 2010). Cependant, à l'heure actuelle, aucune modification du phénotype symbiotique n'a été décrite.

Présentation du sujet de thèse

Dans les interactions plante-microorganismes, le NO a été initialement décrit comme une molécule impliquée dans les mécanismes de défense de l'hôte. La découverte du NO dans des interactions symbiotiques et notamment au cours de la symbiose entre *M. truncatula* et *S. meliloti*, notre modèle d'étude, soulève la question de comment la bactérie fait face à la toxicité du NO. L'équipe a précédemment montré que la réponse de *S. meliloti* au NO est essentielle au maintien de la symbiose. Actuellement, seule la protéine Hmp de *S. meliloti* dont le gène est induit par le NO via le système à 2 composants FixLJ a été identifiée comme un facteur clé du maintien de la symbiose. L'objectif de cette thèse a donc été d'identifier de nouveaux gènes de la réponse bactérienne nécessaire au bon déroulement de l'interaction symbiotique et de caractériser leur rôle en symbiose.

Par ailleurs, il a été montré que le NO joue un rôle positif au cours des étapes précoces et à l'inverse un rôle délétère dans les nodules. L'équipe de recherche à laquelle j'appartiens a suggéré que le NO soit le signal de l'induction de la sénescence des nodules. Les modes d'action du NO dans le processus symbiotique et notamment lors de l'induction de la sénescence des nodules sont à l'heure actuelle inconnus et leur identification constitue un réel

challenge. Un des objectifs de cette thèse a été d'étudier le mode d'action du NO dans l'induction de la sénescence des nodules. Le NO agissant principalement en induisant des modifications post-traductionnelles de protéines, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la tyrosine nitration de protéines bactériennes et végétales.

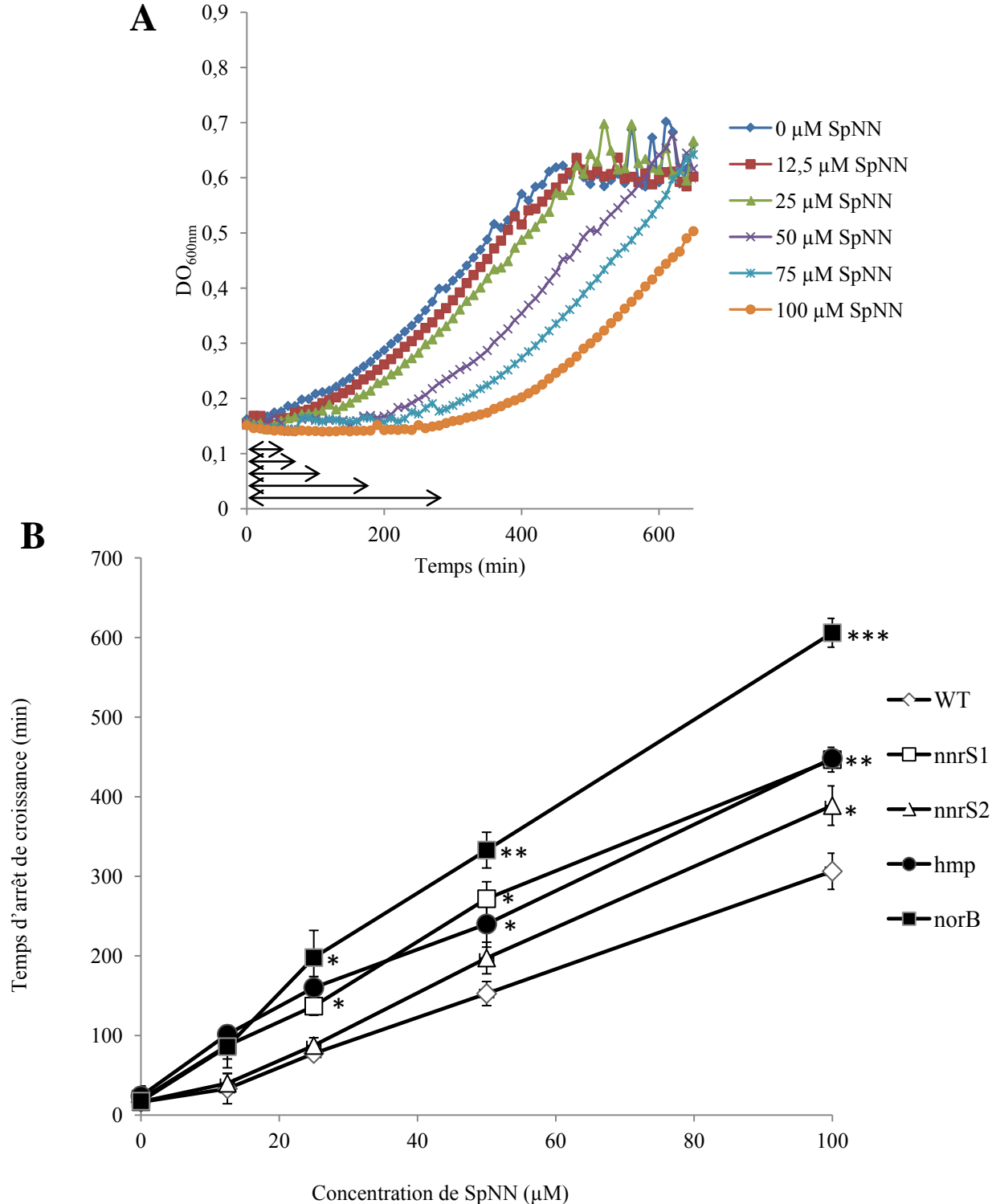
RESULTATS

I) S. meliloti code pour au moins 4 protéines impliquées dans le contrôle du niveau de NO

Le NO est initialement connu pour être une molécule de défense impliquée dans les mécanismes de réponse de l'hôte contre un agent pathogène. En réponse, les pathogènes animaux et végétaux ont développé des mécanismes de protection contre le NO basés principalement sur des systèmes de dégradation et d'adaptation au NO (Cf Intro II-2/3). La récente découverte du NO dans les interactions symbiotiques et notamment au cours de la symbiose entre les légumineuses et les rhizobia suggère que les symbiontes ont aussi mis en place des systèmes de réponse au NO.

L'étude transcriptomique réalisée dans l'équipe en 2010 a révélé qu'une centaine de gènes de *S. meliloti* sont induits par le NO en culture (Meilhoc *et al.*, 2010). De façon intéressante, une quarantaine de ces gènes sont contrôlés par le système FixLJ-FixK, connu pour répondre à la carence en oxygène (condition de microaérobie), suggérant que FixLJ est un senseur à la fois de l'oxygène et du NO. Seize autres gènes sont sous le contrôle de NnrR qui est un régulateur spécifique du NO dont l'expression est indépendante de FixLJ. Enfin, une vingtaine de gènes sont régulés à la fois par NnrR et FixK, probablement en raison du fait que ces 2 régulateurs reconnaissent des séquences régulatrices très similaires. L'étude a aussi révélé que 20 gènes induits par le NO ne sont sous le contrôle ni de NnrR ni de FixLJ, suggérant qu'il existe d'autres régulateurs de réponse au NO chez *S. meliloti*, à ce jour non identifiés.

Parmi la centaine de gènes induits par le NO, plus d'un tiers codent pour des protéines de fonction inconnue ; les autres gènes codent principalement pour des protéines impliquées dans la respiration et la voie de dénitrification. Le gène *hmp* qui est aussi induit par le NO, a retenu l'attention de l'équipe puisqu'il code pour une flavohémoglobine décrite dans d'autres microorganismes pour être un système de dégradation du NO (Cf Intro II-2). L'équipe a montré qu'un mutant insertionnel *hmp* de *S. meliloti* est plus sensible au NO qu'une souche sauvage et à l'inverse, une souche surexprimant *hmp* est plus résistante (Meilhoc *et al.*, 2010). De plus, des plantes de *M. truncatula* inoculées avec le mutant *hmp* génèrent des nodules qui accumulent du NO et qui sénescent précocement (Cam *et al.*, 2012). Ce phénotype de



sénescence précoce s'accompagne d'une diminution de la fixation d'azote et par conséquent d'une réduction du développement des parties aériennes de la plante (Meilhoc *et al.*, 2010, Cam *et al.*, 2012). L'ensemble de ces résultats a montré pour la première fois l'importance de la réponse bactérienne au NO dans le maintien de l'interaction symbiotique.

L'étude de 3 autres gènes de *S. meliloti* induits par le NO, *norB*, *nnrS1* et *nnrS2* a fait l'objet d'une partie de ma thèse. *norB* code pour la sous-unité catalytique de la NO réductase de la voie de dénitrification et catalyse la réduction du NO en N₂O (Cf Intro II-2). Chez *B. japonicum* et *R. etli*, il a été montré qu'en présence de nitrate, la mutation perte de fonction de *norC* (qui code pour une autre sous-unité de la NO réductase) provoque une augmentation du niveau de NO dans les nodules (Gomez-Hernandez *et al.*, 2011 ; Sánchez *et al.*, 2010). Les gènes *nnrS1* et *nnrS2* codent pour 2 protéines homologues de fonction inconnue. Néanmoins, les protéines NnrS1 et NnrS2 présentent une structure secondaire prédite similaire à celle de NorB. Chez les bactéries pathogènes *Vibrio cholerae* et *Neisseria meningitidis*, NnrS est impliquée dans la résistance au NO et serait un acteur important dans la colonisation des cellules de l'hôte (Cf Intro II-3).

1) *NnrS1*, *NnrS2* et *NorB* participent à la résistance au NO en culture

Afin de tester si NorB, NnrS1 et NnrS2 pourraient aussi jouer un rôle dans le contrôle du niveau de NO chez *S. meliloti*, nous avons testé en culture la sensibilité au NO des mutants perte de fonction de ces 3 gènes par rapport à une souche sauvage (Figure 26). Les mutants *nnrS1*, *nnrS2* et *norB* ont aussi été comparés à un mutant *hmp* connu pour avoir une sensibilité accrue au NO. Les mutants *nnrS1* et *norB* sont des mutants d'insertion d'un transposon Tn5 de la collection d'Anke Becker et le mutant *nnrS2* est un mutant de délétion construit au cours de la thèse. Le principe de l'expérience consiste à suivre la croissance des différentes cultures bactériennes traitées avec une gamme de concentrations croissantes de donneur de NO, la spermineNONOate (SpNN). L'ajout de SpNN dans une culture WT provoque un arrêt de croissance dont la durée varie en fonction de la concentration utilisée (Figure 26A). Ainsi, nous avons reporté les arrêts de croissance mesurés en fonction de la concentration du donneur de NO pour les différentes souches (Figure 26B). Nous observons que la souche mutante *nnrS1* présente une sensibilité accrue au NO par rapport à la souche sauvage (WT), similaire à celle du mutant *hmp*. *norB* est plus sensible au NO que les mutants *hmp* et *nnrS1*. Enfin, aux faibles concentrations de SpNN, la sensibilité du mutant *nnrS2* est semblable à celle du WT. En revanche, à plus forte concentration (100 µM de SpNN), *nnrS2* est plus

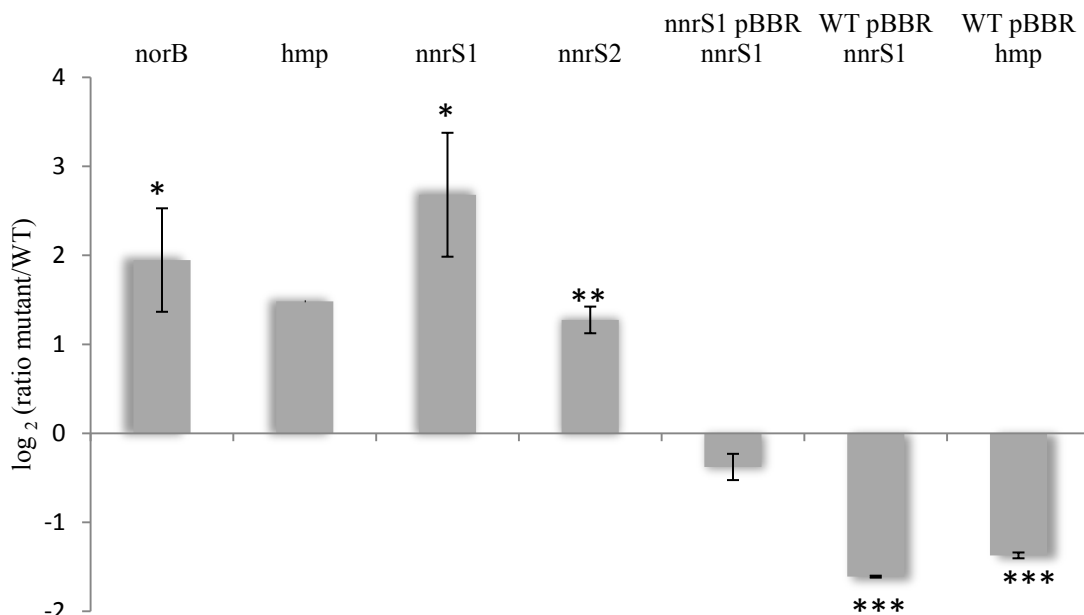


Figure 27: Dosage de la quantité de NO produit par des cultures bactériennes.

Les souches WT, *norB*, *nnrS2*, *nnrS1*, *nnrS1* pBBR *nnrS1*, WT pBBR *nnrS1* et WT pBBR *hmp* ont été cultivées en conditions d'induction de la voie de dénitrification (30 min en microaérobie en présence de 20 mM KNO_3). Le NO libéré par les cultures bactériennes a été dosé directement en utilisant un analyseur de NO (Analyseur par chemiluminescence, modèle 17i, Megatec). Le graphe représente la quantité de NO exprimée en \log_2 du ratio mutant/WT, et correspond à la moyenne de 3 expériences indépendantes (une seule expérience pour le mutant *hmp*). Les barres représentent les erreurs standards. Les moyennes significativement différentes ont été détectées par un test Anova suivi d'un test de comparaison multiple de moyennes appelé test de Tukey. *, ** et *** indiquent une différence significative ($P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement) par rapport au WT.

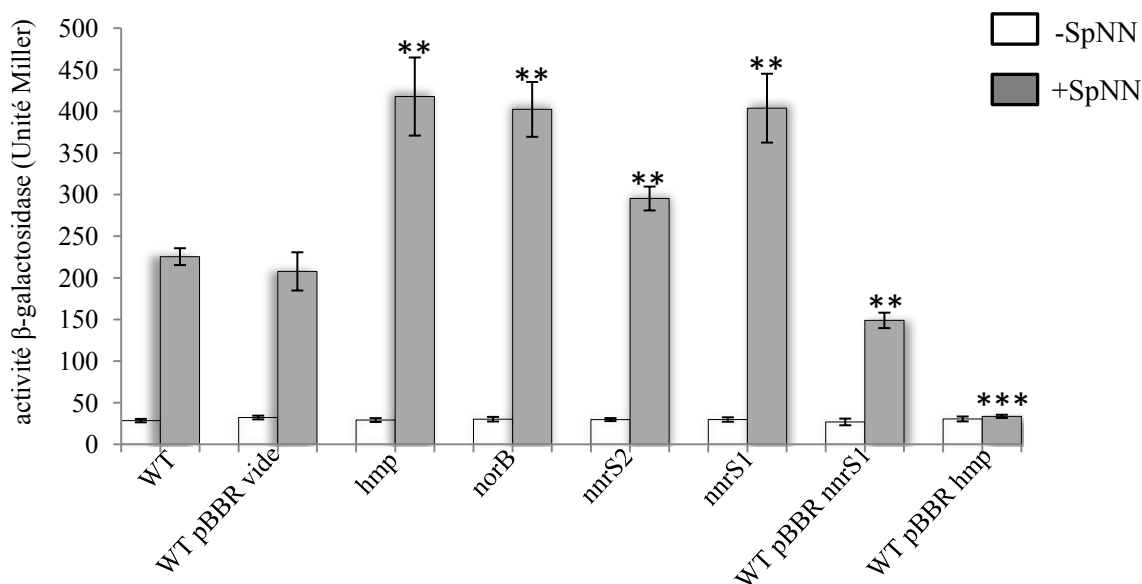


Figure 28: Capacité de dégradation du NO de différentes souches bactériennes en utilisant un biosenseur du NO.

Les souches WT, WT pBBR vide, *hmp*, *norB*, *nnrS2*, *nnrS1*, WT pBBR *nnrS1* et WT pBBR *hmp* contenant le biosenseur du NO (fusion transcriptionnelle entre un promoteur inducible par le NO et le gène *lacZ* qui code pour la β -galactosidase) ont été traitées avec 10 μM de SpNN (■) ou non (□) pendant 1 h. L'activité β -galactosidase a ensuite été dosée. Les valeurs du graphe correspondent à la moyenne de 4 expériences indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Les moyennes significativement différentes ont été détectées par un test Anova suivi d'un test de comparaison multiple de moyennes appelé test de Tukey. ** et *** indiquent une différence significative ($P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement) par rapport au contrôle (WT ou WT pBBR vide).

sensible que le WT. Cette expérience nous permet de conclure que les protéines de *S. meliloti* NnrS1, NnrS2 et NorB, comme Hmp participent à la résistance au NO en culture.

2) *NnrS1 et NnrS2 participent directement ou indirectement à la dégradation du NO en culture*

Une hypothèse serait que NnrS1 et NnrS2, comme Hmp et NorB, soient impliquées dans la dégradation du NO. Pour tester cette éventualité, nous avons dosé le NO dans les cultures à l'aide de 2 méthodes indépendantes. La première méthode consiste à mesurer directement la quantité de NO produit par les cultures bactériennes à l'aide d'un analyseur de NO. Le NO étant une molécule qui diffuse, cette méthode consiste à doser le NO gazeux dégagé par les bactéries. Pour induire la production de NO, nous nous sommes placés dans les conditions permettant d'activer la voie de dénitrification, une voie de synthèse du NO par les bactéries (Figure 12). Ainsi, les cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance ont été incubées pendant 30 minutes en microaérobie en présence de nitrate. Le NO a été mesuré et la figure 27 représente les résultats obtenus. Pour les 4 mutants *norB*, *hmp*, *nnrS1* et *nnrS2* nous observons une augmentation de la quantité de NO produit par rapport à une souche sauvage. L'apport en *trans* d'un plasmide portant le gène *nnrS1* dans un mutant *nnrS1* restaure le phénotype WT. En outre, la surexpression d'*hmp* ou de *nnrS1* dans une souche sauvage diminue de plus de 50 % la quantité de NO produit. Ces résultats suggèrent que NnrS1, NnrS2 et NorB sont impliquées dans la dégradation du NO en culture. Par ailleurs, il est intéressant de noter que le phénotype du mutant *nnrS1* est plus prononcé que celui de *norB* dont la fonction de dégradation du NO est connue, suggérant un rôle crucial de NnrS1 dans le contrôle du niveau de NO dans ces conditions. En revanche, *nnrS2* ne présente une augmentation de la quantité de NO que d'un facteur 2, suggérant une activité de dégradation du NO moindre.

Ces résultats ont été confirmés par une deuxième approche qui révèle la capacité de dégradation du NO des différentes souches de *S. meliloti* (Figure 28). Le principe de l'expérience consiste à introduire dans les différentes souches un biosenseur du NO, constitué d'une fusion transcriptionnelle entre un promoteur inductible par le NO (promoteur du gène *SMa1289*, Meilhoc *et al.*, 2010) et le gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase (Del Giudice *et al.*, 2011). Les cultures en phase exponentielle de croissance ont été traitées avec un donneur de NO (SpNN 10 μ M) pendant 1 h. Nous avons alors dosé l'activité β -galactosidase qui reflète indirectement la quantité de NO présent dans les cultures (Figure 28). En contrôle, le

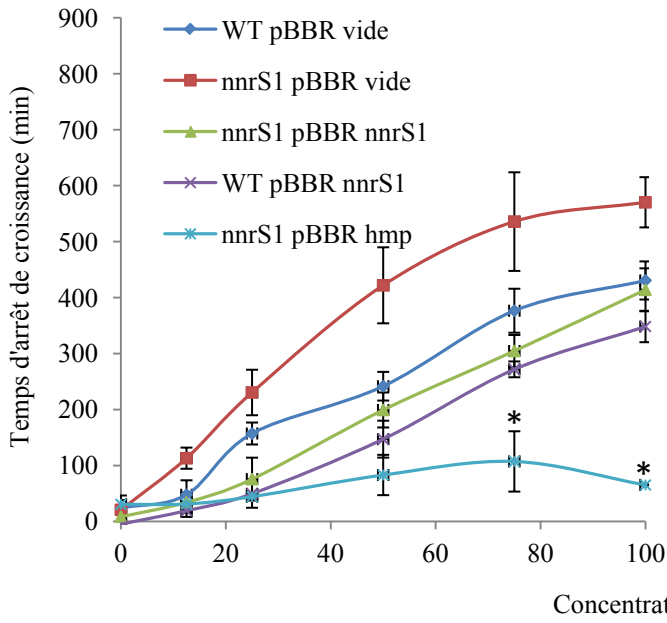
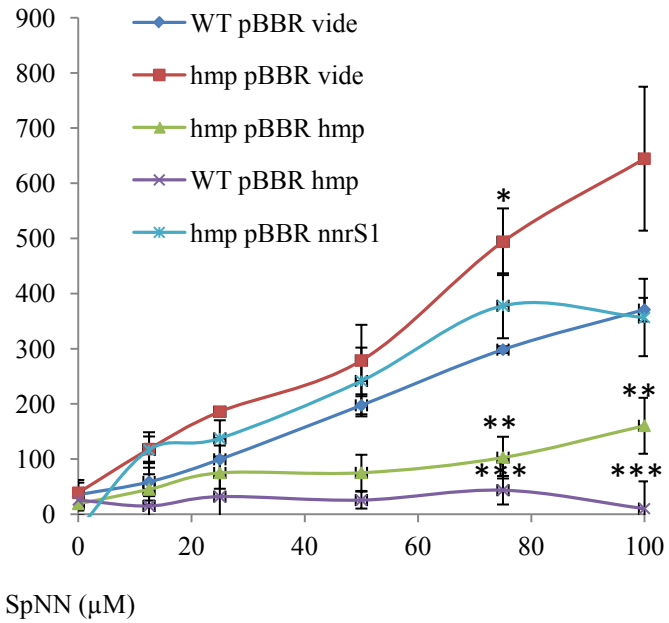
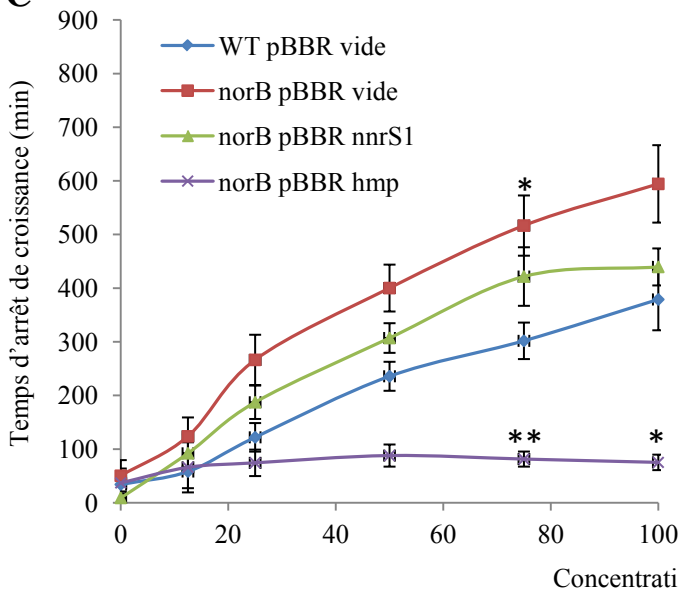
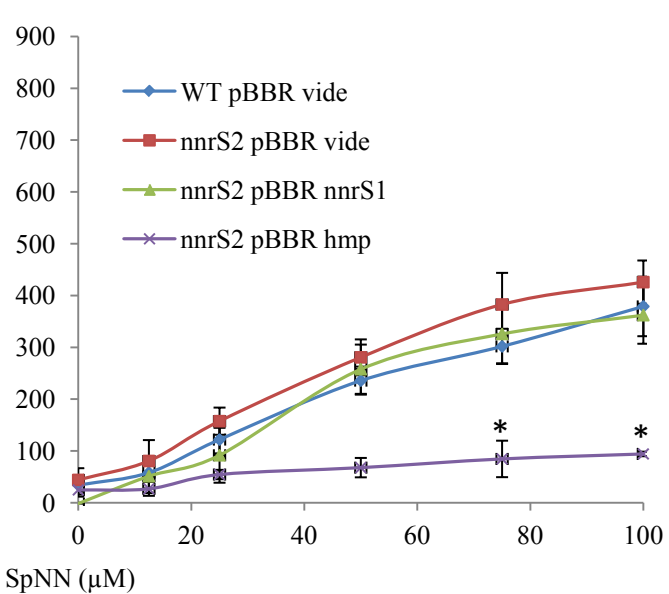
A**B****C****D**

Figure 29: Tests de complémentation fonctionnelle en culture.

Le plasmide pBBR vide, le pBBR *hmp* ou le pBBR *nnrS1* a été introduit dans les souche WT et les mutants *nnrS1*, *hmp* et *norB*. Les différentes souches ont été cultivées avec ou sans donneur de NO (SpNN) à différentes concentrations (12.5, 25, 50, 75 et 100 μM). La croissance bactérienne a été suivie par mesure de l'absorbance (DO_{600nm}). L'ajout de SpNN provoque un arrêt de croissance des bactéries plus ou moins important selon la concentration de donneur de NO utilisée. Les graphes représentent les temps d'arrêt de croissance en fonction de la concentration en SpNN pour les différentes souches et correspondent à la moyenne de 3 expériences indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Un test statistique d'Anova suivi d'un test de Tukey ont été effectués pour les concentrations de 75 et 100 μM de SpNN. *, ** et *** indiquent une différence significative ($P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement) par rapport au WT pBBR vide.

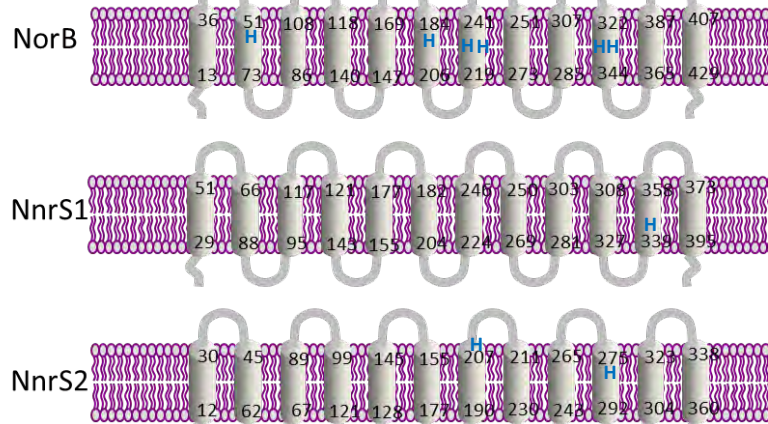
dosage de l'activité β -gal a été effectué dans des cultures non traitées avec le NO. Nous observons que suite au traitement avec le donneur de NO, les mutants *nnrS1* et *norB* présentent une activité β -galactosidase environ 2 fois supérieure à celle observée pour une souche sauvage suggérant une accumulation de NO et donc un défaut de dégradation du NO dans ces mutants. Ce résultat est similaire à celui obtenu pour le mutant *hmp*. Le mutant *nnrS2* accumule aussi davantage de NO mais moins que *nnrS1* et *norB* suggérant une activité de dégradation du NO moins importante. Enfin, nous avons quantifié l'activité β -gal dans les souches surexprimant *nnrS1* ou *hmp* (WT pBBR *nnrS1* et WT pBBR *hmp* respectivement) et nous avons observé qu'elle est diminuée par rapport à une souche WT contenant le plasmide vide (WT pBBR vide) particulièrement pour la souche surexprimant *hmp*. L'ensemble de ces résultats montre que NnrS1 et NnrS2, comme Hmp et NorB, participent directement ou indirectement à la dégradation du NO en culture.

3) *NnrS1*, *NnrS2*, *Hmp* et *NorB* agissent indépendamment en culture

Nous nous sommes ensuite demandé si ces 4 protéines pouvaient agir en complexe ou si la fonction d'une des protéines dépendait de la présence d'une ou des autre(s) protéine(s). Pour étudier cette hypothèse nous avons réalisé des tests de complémentation fonctionnelle de mutants de ces protéines en culture. Pour cela, nous avons analysé la sensibilité au NO des différentes souches portant un plasmide qui surexprime soit NnrS1 soit Hmp. Les souches portant le plasmide vide ont été utilisées comme contrôle. Les résultats sont présentés dans la figure 29. Comme vu précédemment, le mutant *nnrS1* (portant le plasmide vide) est plus sensible au NO que la souche WT (Figure 29A). Une sensibilité similaire à celle du WT est restaurée lorsque l'on introduit dans cette souche le plasmide portant *nnrS1* ce qui confirme que le phénotype du mutant *nnrS1* est bien lié à la mutation de ce gène. La résistance au NO de la souche WT renfermant le plasmide pBBR *nnrS1* est augmentée confirmant que NnrS1 est impliquée dans la résistance au NO. Enfin, un mutant *nnrS1* portant le plasmide pBBR *hmp* présente une forte résistance au NO (nettement supérieure à celle du WT) ce qui montre que le phénotype de sensibilité du mutant *nnrS1* est restauré par la surexpression de *hmp*. La réciproque est vraie puisque le plasmide portant *nnrS1* complémente le phénotype de sensibilité du mutant *hmp* (Figure 29B). Ces résultats suggèrent que NnrS1 et Hmp agissent indépendamment l'une de l'autre. De façon similaire, nous avons montré que NorB agit indépendamment de Hmp et NnrS1 puisque le phénotype de sensibilité du mutant *norB* est reversé par l'apport en *trans* de *nnrS1* ou *hmp* (Figure 29C). Il est intéressant de noter que la

A

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|--|--|
| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | | | | | | |
| Ic1InnrS1 | MSGSKYAKREGYVPRGFARTGPVLFSGYGRPFLLGAAVMAVYAMTLIAALYGHLEVAGSYGAHAWAHHEMLFGFAPAVLAGFLLTAVPNMT-GRLPVSGWPLAGLFTLMLAGRAALLS---PDVIGIPP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrS2 | MSSINRAPYRPLFLFAGLWALIVPIVHL-----LPEQLVPDRVEHHSRELLFGMGGAAGGYLLTALPAWTRGAVPPARTVIATC--LWCAARLTGAF---SDHLPLIA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrB | MKYQTQKYAMLYFYGALGLFLAQILFGVLAGTIYYPNTLSPELLPFNIYRMHFNALIVMLLMGFMGATYYLLPEEAETELYSKPIAIAQWIFLIAAVAVYVYLLHIHIEGREFLE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Consensus |l..yg..rp1f1.a.lwv.a.t.w.....l.....r..wh..e.lfg..ga..ag%lta.pawt.g..P..a...a..f..lw..A..r..g.....#..... | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 131 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | | | | | | |
| Ic1InnrS1 | AARIDGLFLPALLLICAREYIAGRKHKDLKVLGGLLALLSLANCFHFVVYTGDAHVHIAHRLGISAYVALVTIIG6---RILPSFTRNMLNRAGRTFEPVPYNNHFDTVAILAGIAALGAWTLAPDHP-- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrS2 | AATIGVSGYFAFLTAMLRGVVYSRAHARCNAPLGTGALGV-NAFYSIADGSPPTPLL---FAALIVVVG6---RAVPAFTGSMLYRTAGGKSLNRRELSHLAVAGILITATFUGDMSPTL-- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrB | QPFAIKYGVIVVVALHFLFNITLTLYLKGRKTTYTNILIFGLMGVAIFFLFAFYNPVNLALDKMYMAYVQLWVEGVWELIHASVLAFLMIKLMGIDREVVEKALYIVGLALFSGILGTCHVYVWIGAPGY | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Consensus | aa.....l..ln..r..!...r..u..r.....g..lalgl..na...fa.....v..la.....%val..!..Gg.....r..vpaFt...uLn..r.....lA...gi..atg..h..w...p.. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 261 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | | | | | | |
| Ic1InnrS1 | -----VTAVPAFAALLHTYVRLARWRGWRTPPEMLVILHVA---YAFYPLGF-----AATGIGAL--GFVEELSVMHVLTVGATIAHMLAYHTRASRGHTGYPLTASRLTARSY-AAVYLSALLRP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrS2 | -----PGLLLLSGAML-LWQHSEWRSLSGTRGYPALFILHVA---FAHTPTAL-----LLGGLSATISGHVPADALHALTHGANGTHIAAFHMRPAHYRDGESLILGGTMAGAF-SLVSLALLRT | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrB | HQMIGSLFSTLEVPFFTHVVFTEVHTAKAGRKHPNKARLLWSIGCSVMHFFGAGVMGFLHTLSVNYYYTHGTQYTAHGLAFFFGAYVHLNLAVMAYAIPEIRGRAPYNQLSIASFAMCSAHSYHTF | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Consensus |t1..af...a%1.....Hr..rt..p...al..ilh!a...Af..p..g.....l.g..a...G.v.....H..lt..Gh...\$.lAwM.ra...G..l....l..aas%.a.vsal\$..r.. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 391 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 461 | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrS1 | LAEMLPETAPTLAYVSGSAWILAFALFCIEYGPIL-VRKRRAYQ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrS2 | SGGMLDADHFEPEAAARICWAGATLFLIAYLPAM-SGPVPRPFAFSAAALGNQYKRGNGTPPNKAGCLCP | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Ic1InnrB | ALTFAGVYVHQLQRYLGESMAYQEQLALFYHILRGSGVYVLISALMFFHAYLVPGKRASPALNQAYQPAE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Consensus |l.....l..av..g..uma...lf..i..Y..p..\$.sg.v.....g.....P.....P.. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

B

NnrS1

NnrS2

C

Figure 30: Homologies entre NnrS1, NnrS2 et NorB

A-Alignement de séquences protéiques avec le logiciel Multalin. Les 6 histidines de NorB nécessaires à la fixation des hèmes sont entourées en rose B-Structures secondaires des protéines NnrS1, NnrS2 et NorB. Les chiffres indiquent la position des acides aminés délimitant chaque domaine transmembranaire et les H indiquent la position des histidines C-Prédiction de la structure 3D de NnrS1 et NnrS2 avec le logiciel I-TASSER

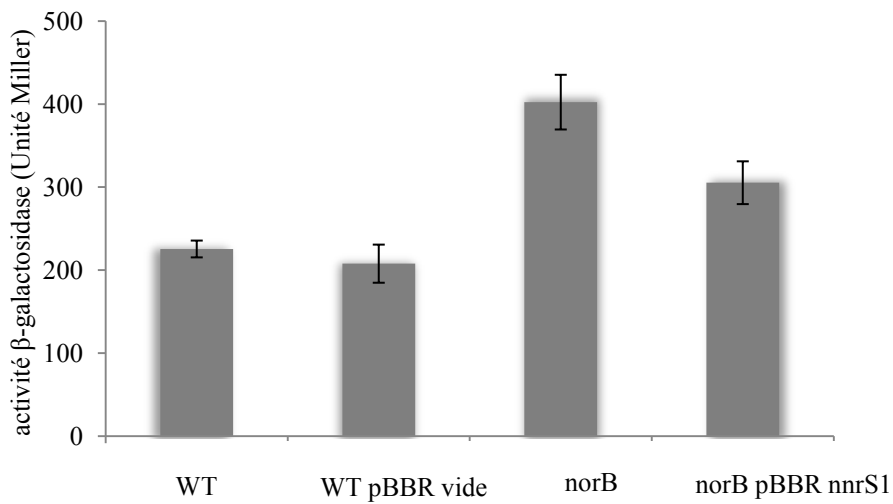


Figure 31: Complémentation partielle d'un mutant *norB* par la surexpression de NnrS1

Dans le mutant *norB* contenant le biosenseur, le plasmide surexprimant *nnrS1* (pBBR *nnrS1*) a été introduit (souche notée *norB* pBBR *nnrS1*). Les différentes souches WT, WT pBBR vide, *norB* et *norB* pBBR *nnrS1* ont été traitées avec 10 μ M de SpNN pendant 1 h. L'activité β -galactosidase a ensuite été dosée. Les valeurs du graphe correspondent à la moyenne de 2 expériences indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards.

résistance au NO est toujours plus forte pour les souches renfermant le pBBR *hmp* que pour celles portant le plasmide pBBR *nnrS1*. Ce résultat pourrait s'expliquer par une plus forte expression du gène *hmp* que celle du gène *nnrS1* dans ces conditions d'expérimentation. Pour la complémentation du mutant *nnrS2* par *nnrS1*, les résultats sont moins convaincants en raison du phénotype moins prononcé du mutant *nnrS2* (Figure 29D). En revanche, l'ajout du plasmide portant *hmp* rend la souche très résistante au NO.

Ces expériences confirment les résultats précédents quant aux rôles de NnrS1 et NorB dans la résistance au NO en culture et montrent que NnrS1, NorB et Hmp agissent indépendamment en culture.

4) *NnrS1* semble avoir une activité NO réductase

Bien que l'homologie de séquence entre les protéines NnrS1, NnrS2 et NorB soit faible (30 % d'identité entre NnrS1 et NnrS2 mais seulement 13,4 et 13,7 % avec NorB respectivement), NnrS1 et NnrS2 ressemblent structurellement à NorB (Figure 30). En effet, ces 3 protéines sont prédites pour posséder 12 domaines transmembranaires, et parmi les 6 histidines de NorB nécessaires à la fixation de groupements hèmes, 1 et 2 sont retrouvées chez NnrS1 et NnrS2 respectivement. Nous nous sommes donc demandé si NnrS1 et NnrS2 possédaient une activité NO réductase. Un premier élément de réponse nous a été apporté par l'expérience montrant que la surexpression de NnrS1 dans un fond génétique *norB* (noté *norB* pBBR *nnrS1*) permet de compléter partiellement le phénotype de surproduction de NO du mutant *norB* (Figure 31). Ce résultat suggère que NnrS1 pourrait avoir une fonction similaire à NorB.

Pour étayer cette hypothèse, nous avons dosé le produit de la réaction d'une NO réductase (N_2O) synthétisé par différentes cultures bactériennes. Pour cela nous avons traité les cultures avec 5 μM de SpNN (le NO est le substrat de la réaction d'une NO réductase) et nous avons dosé le N_2O produit par chromatographie en phase gazeuse (Figure 32). En absence de SpNN (WT-NO), du N_2O est détecté bien que la quantité soit environ 60 % moins importante que lorsque la culture est traitée avec 5 μM de SpNN (Figure 32A). Ce N_2O résiduel détecté en absence de donneur de NO doit provenir de l'air (les cultures sont placées en microaérobie et le N_2O est un gaz retrouvé dans l'air). L'analyse du dosage du N_2O produit par les mutants *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB* n'a révélé aucune différence significative par rapport au WT (Figure 32A). Ce résultat peut s'expliquer par des redondances fonctionnelles.

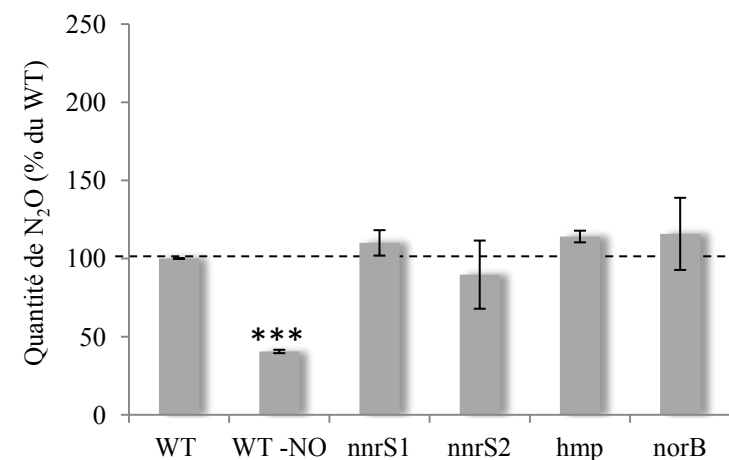
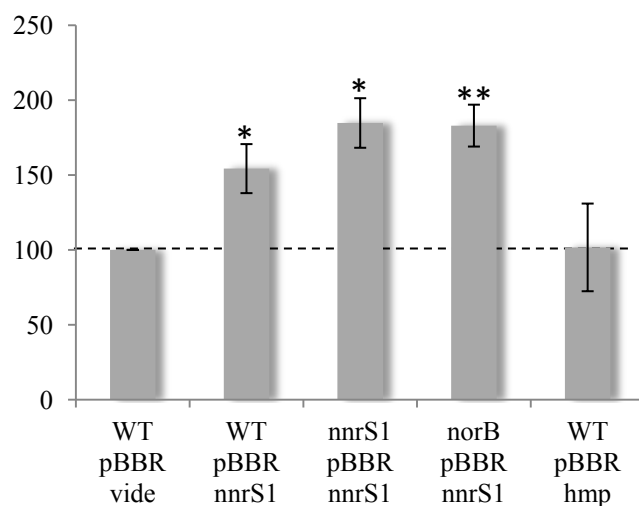
A**B**

Figure 32: Dosage par chromatographie en phase gazeuse de la quantité de N₂O produit par les cultures bactériennes. Les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp*, *norB*, WT pBBR vide, WT pBBR *nnrS1*, WT pBBR *hmp*, *nnrS1* pBBR *nnrS1* et *norB* pBBR *nnrS1* ont été incubées pendant 30 min en conditions de microaérobiose. Le donneur de NO, SpNN (5 μ M) est ajouté dans les cultures et après 1 h d'incubation, les échantillons d'air sont collectés dans chaque erlen contenant les cultures. L'analyse de la quantité en N₂O est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse. Pour calibrer les valeurs obtenues, tous les 10 échantillons injectés, du N₂O standard commercial (de haute précision est injecté (988 \pm 49 ppbv, Air Liquide). Les échantillons sont injectés en duplicats et présentent une variabilité entre eux inférieure à 5 %. Les valeurs présentées sur le graphe correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expériences indépendantes. Les barres représentent les erreurs standards. Les moyennes significativement différentes ont été détectées par un test Anova suivi d'un test de comparaison multiple de moyennes appelé test de Tukey *, ** et *** indiquent une différence significative (P<0.05, P<0.01 et P<0.001 respectivement) par rapport au contrôle (WT ou WT pBBR vide).

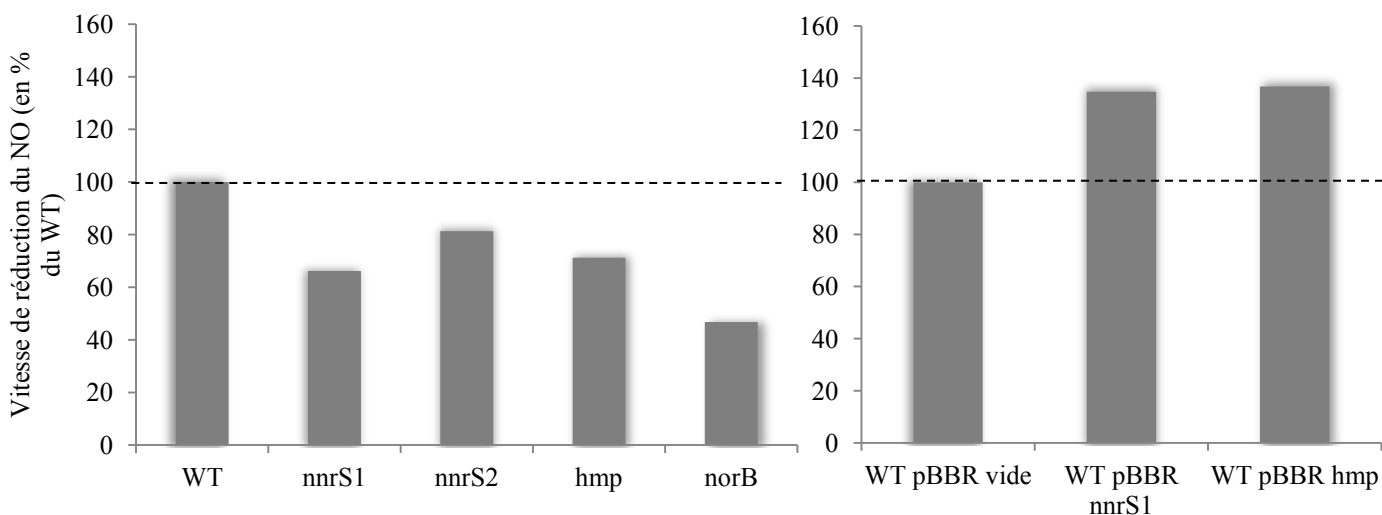


Figure 33: Dosage d'une activité NO réductase en utilisant le Méthyl Viologen. Le Méthyl Viologen (MV), qui est un donneur d'électron est bleu sous forme réduite (donneur d'électron) et incolore sous forme oxydée. Ainsi, la réduction du MV s'accompagne d'une disparition de la couleur bleue qui peut être suivie par spectrophotométrie. Dans des cultures bactériennes incubées en microaérobiose du MV réduit de couleur bleue a été ajouté. Une solution de donneur de NO a été ajoutée et la vitesse de disparition de la coloration bleue qui reflète la vitesse de réduction du NO a été suivie au spectrophotomètre. Le graphe représente la vitesse de réduction du NO pour les souches en pourcentage de la valeur obtenue pour la souche WT ou WT pBBR vide et correspond à une seule expérience (résultats préliminaires).

En effet, il est envisageable que l'incubation des cultures en microaérobie active un système compensatoire de réduction du NO. Par ailleurs, il est possible que la méthode ne soit pas assez sensible pour détecter des différences entre la souche sauvage et les mutants. En revanche, nous observons qu'une surproduction de NnrS1 dans un fond génétique WT (WT pBBR *nnrS1*), *nnrS1* (*nnrS1* pBBR *nnrS1*) ou *norB* (*norB* pBBR *nnrS1*) conduit à une plus forte production de N₂O par rapport à une souche WT contenant le plasmide vide (WT pBBR vide). Ce résultat suggère que NnrS1 a une activité NO réductase. Par contre, la surexpression d'*hmp* (WT pBBR *hmp*) ne conduit pas à une augmentation de la quantité de N₂O produit.

Pour confirmer ce résultat, nous avons dosé l'activité de réduction du NO de différentes souches en utilisant une approche basée sur l'oxydation du Méthyl Viologen (MV). Le MV qui est un donneur d'électron, est de couleur bleue sous forme réduite et incolore sous forme oxydée. Ainsi, l'oxydation du MV s'accompagne d'une disparition de la coloration bleue qui peut être suivie par spectrophotométrie. Dans des cultures bactériennes du MV réduit de couleur bleue a été ajouté. Une solution de donneur de NO a été ajoutée et la disparition de la coloration bleue, qui reflète la réduction du NO, a été suivie au cours du temps. Les résultats présentés en figure 33 indiquent la vitesse de réduction du NO (en pourcentage de la souche sauvage) pour les différentes souches et correspondent à une seule expérience (résultats préliminaires). Pour la souche *norB* qui constitue notre contrôle, nous avons observé une diminution de l'ordre de 50 % de l'activité de réduction du NO par rapport à une souche sauvage. De façon intéressante, les mutants *nnrS1*, *nnrS2* et *hmp* présentent aussi une diminution de l'activité de réduction du NO par rapport au WT particulièrement pour *nnrS1* (40 % de diminution). Les souches surexprimant NnrS1 (WT pBBR *nnrS1*) et Hmp (WT pBBR *hmp*) présentent quant à elles une augmentation d'environ 30 % de l'activité de réduction du NO par rapport à une souche contenant le plasmide vide (WT pBBR vide). L'ensemble de ces résultats suggère que NnrS1 et Hmp ont une activité de réduction du NO. Pour Hmp, en condition de carence en oxygène, il avait déjà été décrit que cette protéine peut disposer d'une activité de réduction du NO (Cf Intro II-2). Pour le mutant *nnrS2*, il est plus difficile de conclure ne disposant pas d'une souche surexprimant NnrS2. Les résultats précédents de dosage du N₂O (produit de la réaction d'une NO réductase) couplés avec ces derniers résultats suggèrent fortement que NnrS1 possède une activité NO réductase.

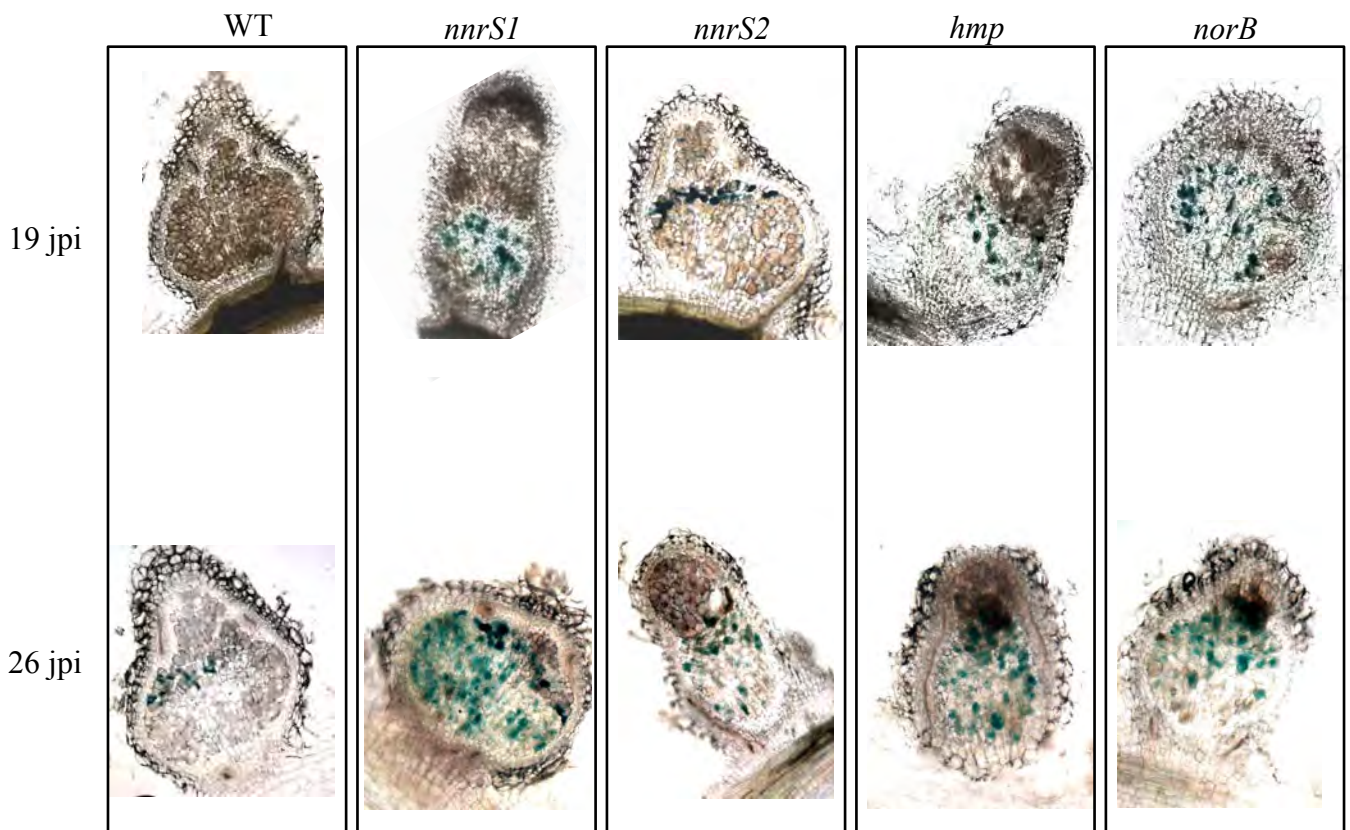


Figure 34: Visualisation du NO sur des coupes de nodules en utilisant des souches bactériennes contenant le biosenseur du NO. Des nodules obtenus 19 et 26 jours post-inoculation (jpi) avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB* contenant le plasmide biosenseur du NO ont été coupés à l'aide d'un vibratome (60 μ m). Les coupes ont ensuite été traitées avec le X-gal, un substrat chromogène de la β -galactosidase, puis observées au microscope optique. Les images sont représentatives de 2 expériences indépendantes.

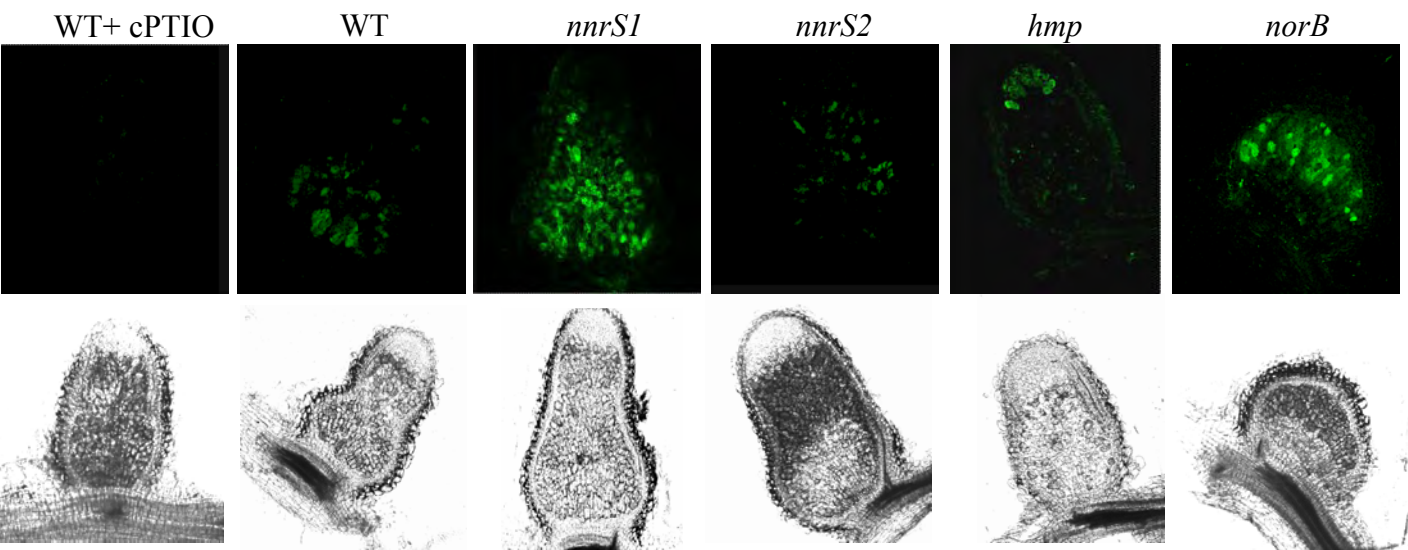


Figure 35: Visualisation du NO sur des coupes de nodules en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO (DAF-2DA). Des nodules obtenus 19 jours post-inoculation avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB* ont été coupés à l'aide d'un vibratome (60 μ m). Les coupes ont ensuite été traitées avec la sonde perméante fluorescente spécifique du NO (DAF-2DA) puis observées au microscope confocal. Quelques coupes de nodules sauvages ont au préalable été traitées avec le cPTIO, un piègeur de NO permettant ainsi de contrôler la spécificité de la sonde. Les images de la partie inférieure de la figure correspondent aux observations en fond clair. Les images sont représentatives de 4 expériences indépendantes.

5) *NnrS1 et NnrS2 participent directement ou indirectement à la dégradation du NO dans les nodules symbiotiques*

Nous nous sommes ensuite demandé si ces protéines pouvaient aussi avoir un rôle dans le contrôle du niveau de NO dans les nodules symbiotiques de *M. truncatula*. Une analyse transcriptomique par RNA seq et microdissection de nodules de *M. truncatula* conduite en 2014 au sein du laboratoire a révélé que les gènes *nnrS1*, *nnrS2* et *norB* sont exprimés dans les nodules particulièrement en zone III (Roux *et al.*, 2014). Ce résultat suggère que ces 3 protéines, en plus d'un rôle en vie libre, pourraient aussi avoir un rôle dans l'interaction symbiotique. Pour tester cette hypothèse, nous avons inoculé les plantes de *M. truncatula* avec les mutants *nnrS1*, *nnrS2*, *norB* et *hmp* (le mutant *hmp* a déjà été décrit comme étant nécessaire au contrôle du niveau de NO dans les nodules et sert ici de référence) et nous avons ensuite quantifié le NO dans les nodules en utilisant 2 approches distinctes. La première approche est basée sur l'utilisation de souches bactériennes contenant le biosenseur du NO décrit précédemment. Des coupes de nodules obtenus 19 et 26 jours post-inoculation ont été traitées avec le X-gal, un substrat chromogène de la β -galactosidase et nous avons observé la coloration bleue en microscopie optique (Figure 34). 19 jours post-inoculation, les nodules induits par la souche WT sont dépourvus de coloration. Par contre, les nodules induits par chacun des 4 mutants présentent une coloration bleue localisée principalement en zone III pour les mutants *nnrS1*, *norB* et *hmp* et au niveau de l'interzone II/III pour le mutant *nnrS2*. Plus tard, 26 jours post-inoculation, les nodules WT présentent une coloration bleue au niveau de l'interzone II/III comme observée à 19 jours pour les nodules induits par *nnrS2*. Pour les mutants *nnrS1*, *hmp* et *norB* la coloration bleue s'intensifie et reste localisée en zone III. Quant aux nodules induits par le mutant *nnrS2*, la coloration devient plus éparse et se localise aussi en zone III. L'ensemble de ces observations montre que les nodules induits par les mutants *nnrS1*, *nnrS2* et *norB* accumulent plus de NO que les nodules sauvages, particulièrement pour *nnrS1* et *norB* qui présentent une forte intensité de coloration.

La deuxième approche de visualisation du NO dans les nodules est basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente perméante spécifique du NO, la DAF-2DA. Grâce à son groupement hydrophobe diacétate (DA), cette sonde va traverser les membranes, puis va être transformée en DAF-2 par l'action d'estérases cellulaires. La sonde DAF-2 va interagir spécifiquement avec le NO pour donner un composé triazole fluorescent, le DAF-T. Nous avons traité des coupes de nodules obtenus 19 jours post-inoculation avec cette sonde et nous avons observé la fluorescence en microscopie confocale (Figure 35). Pour s'assurer de la

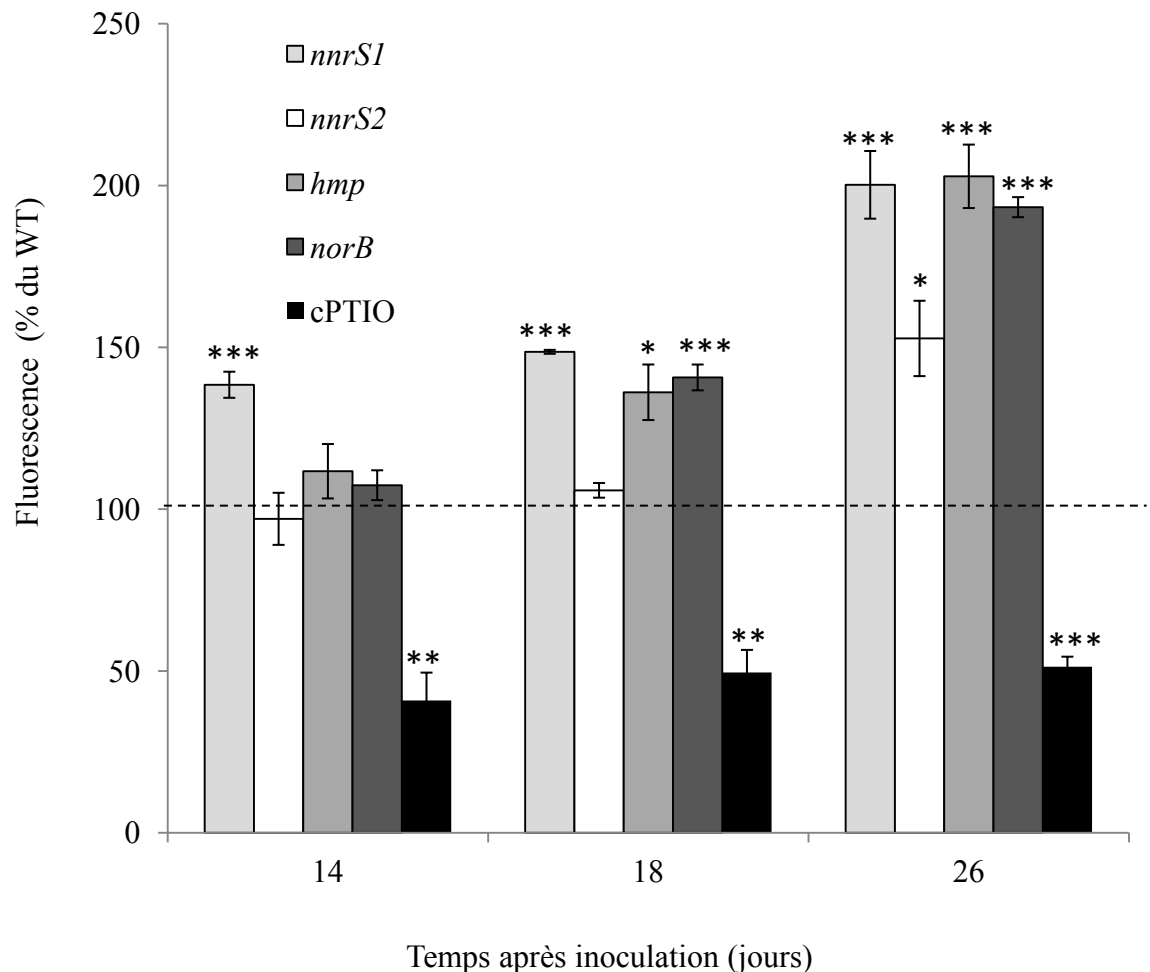


Figure 36: Quantification du NO dans les nodules en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO non perméante (DAF-2)

Des plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec *S. meliloti* WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* ou *norB*. La production de NO a été mesurée 14, 18 et 26 jours post-inoculation en utilisant la sonde non perméante fluorescente spécifique du NO (DAF-2). Pour contrôler la spécificité de la sonde, 1 mM de cPTIO a été additionné 30 minutes avant l'addition de la sonde dans un puits contenant des nodules WT. La fluorescence est exprimée en pourcentage de la fluorescence obtenue pour des nodules sauvages au temps correspondant. Les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en duplicat. La ligne en pointillée indique la valeur obtenue pour le WT. Les barres correspondent aux erreurs standards. Les moyennes significativement différentes ont été détectées par un test Anova suivi d'un test de comparaison multiple de moyennes appelé test de Tukey. *, ** et *** indiquent une différence significative ($P < 0.05$, $P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement) par rapport au WT.

spécificité de la sonde, quelques coupes de nodules sauvages ont été traitées au préalable avec un piègeur de NO, le cPTIO. Nous observons que les nodules induits par les mutants *nnrS1* et *norB* présentent une forte fluorescence par rapport aux nodules sauvages ce qui confirme qu'il y a une accumulation de NO dans ces nodules. Pour les nodules élicités par *nnrS2*, 19 jours post-inoculation, il n'y a pas de différence majeure avec les nodules sauvages ce qui est en faveur d'une moindre implication de NnrS2 dans le contrôle du niveau de NO.

Les 2 approches décrites ci-dessus sont qualitatives. Pour quantifier le NO dans les nodules, nous avons utilisé une méthode basée sur l'utilisation d'une sonde fluorescente spécifique du NO non perméante, la DAF-2. Le principe de l'expérience consiste à disposer des nodules entiers dans un puits d'une plaque contenant un tampon phosphate additionné de la DAF-2. Le NO va diffuser dans le milieu et interagir avec la sonde pour donner un signal fluorescent quantifié par un lecteur de plaque à fluorescence. La quantité de NO libérée dans le milieu étant proportionnelle à celle présente à l'intérieur des nodules, cette expérience permet de quantifier le NO dans les nodules induits par les différents souches. La figure 36 représente la fluorescence (exprimée en pourcentage de la fluorescence mesurée dans les nodules sauvages) en fonction des différents génotypes bactériens et à différents temps (14, 18 et 26 jours après inoculation. Pour s'assurer de la spécificité de la sonde, des nodules sauvages ont été au préalable traités avec le cPTIO, un piègeur de NO. Dans ce cas, la fluorescence obtenue représente 40 % de celle mesurée du sauvage et la valeur est constante en fonction du temps. 14 jours post-inoculation, nous observons que les nodules induits par le mutant *nnrS1* présentent une fluorescence environ 40 % supérieure à celle mesurée dans les nodules induits par la souche sauvage. Ce résultat suggère que le niveau de NO dans les nodules occupés par la souche *nnrS1* est plus important que celui présent dans les nodules WT. Plus tardivement, à 18 jours, les nodules induits soit par *hmp* soit par *norB* montrent une augmentation de la fluorescence par rapport aux nodules sauvages. Enfin, 26 jours après inoculation, les nodules des plantes inoculées avec le mutant *nnrS2* présentent aussi une augmentation de la fluorescence. Ces résultats confirment les résultats précédents quant aux rôles de NnrS1, NnrS2 et NorB dans le contrôle du niveau de NO et démontrent que ces protéines en plus d'agir en vie libre ont un rôle dans les nodules symbiotiques.

En conclusion, nous avons identifié 3 protéines de *S. meliloti* impliquées dans le contrôle de la quantité de NO dans les nodules symbiotiques : NnrS1, NnrS2 et NorB. Ces protéines qui participent aussi à la résistance au NO en culture, ont une activité directe ou

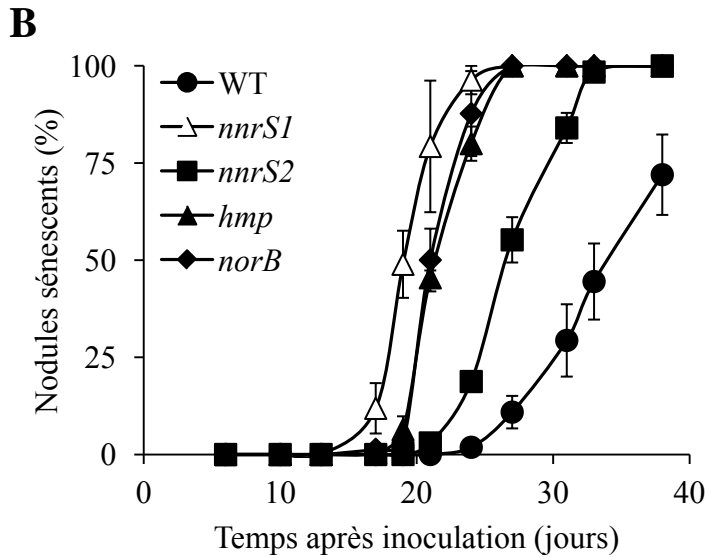
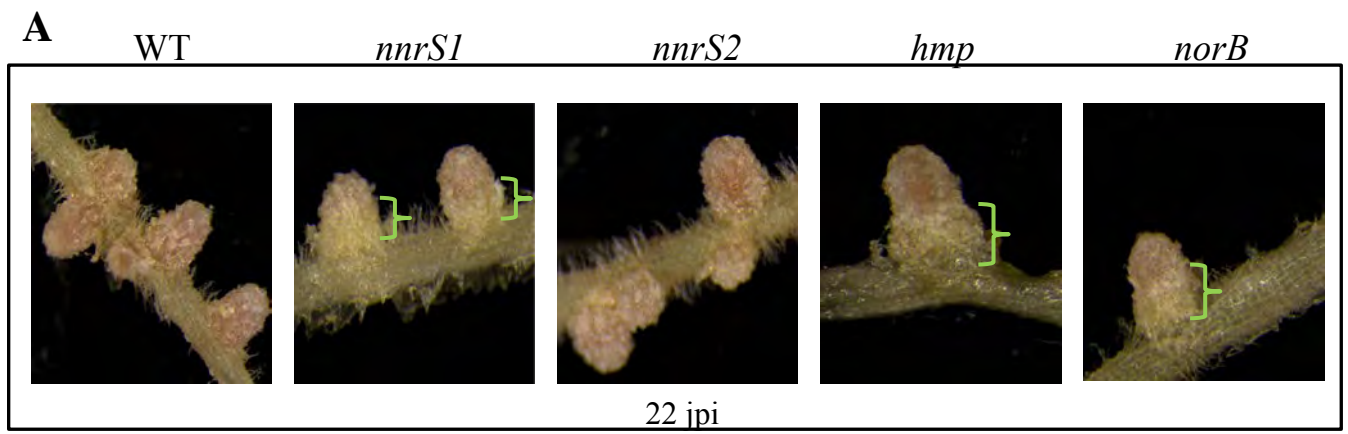


Figure 37: Cinétique d'apparition des nodules sénescents sur les racines de plantes inoculées avec différentes souches de *S. meliloti*

A- Observations à la loupe binoculaire de nodules induits par les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* ou *norB* 22 jours post-inoculation. Les accolades délimitent la zone verte. B- Suivi de la sénescence des nodules au cours du temps exprimée en pourcentage du nombre total de nodules. Un nodule est considéré comme sénescant lorsqu'il présente une base verte. Les données représentent la moyenne des valeurs obtenues pour 3 expériences indépendantes. Chaque expérience comporte une série de 10 plantes pour chaque génotype bactérien. Les barres correspondent aux erreurs standards. A 21, 24 et 31 jours post inoculation un test statistique d'Anova suivi d'un test de Tukey ont été effectués et des différences significatives ($P < 0.05$) ont été observées entre chaque mutant et le WT.

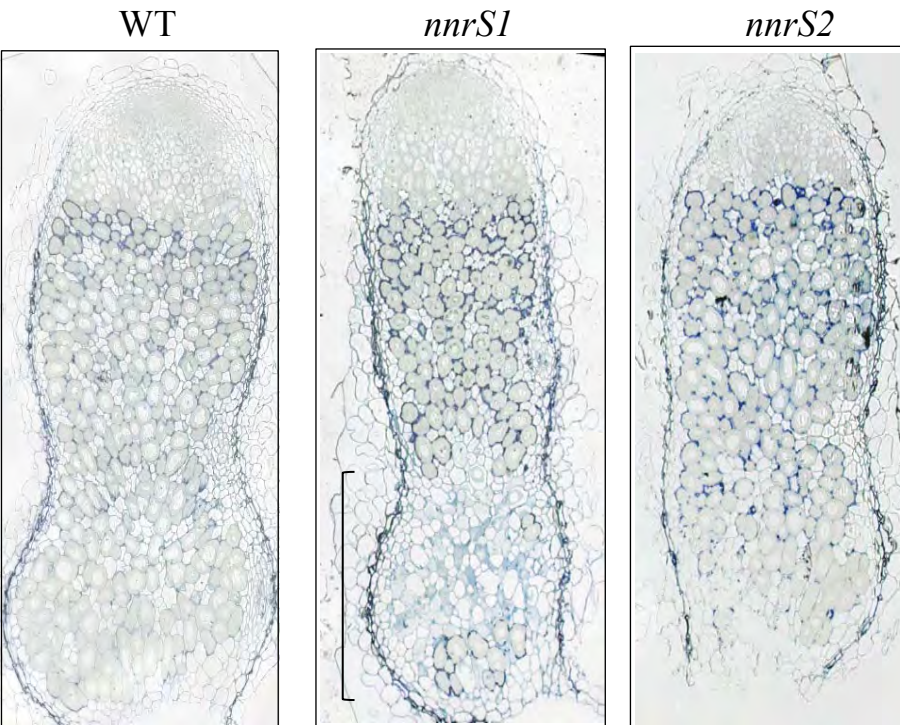


Figure 38: Observations microscopiques de la sénescence des nodules

Des plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB*. 20 jours post-inoculation les nodules prélevés ont été coupés avec un vibratome (2 μ m) puis colorés avec du bleu de toluidine. Le bleu de Toluidine permet de mettre en évidence les structures hydrophobes. Les observations ont été réalisées avec un microscope optique. Seuls les résultats obtenus pour les nodules induits par le WT, *nnrS1* et *nnrS2* sont représentés. L'accolade délimite la zone de sénescence.

indirecte de dégradation du NO. Des résultats préliminaires suggèrent que *NnrS1* possède une activité NO réductase.

II) Les plantes inoculées avec les mutants *nnrS1*, *nnrS2* ou *norB* présentent une sénescence précoce des nodules

1) Caractérisation macroscopique et microscopique de la sénescence des nodules formés par les mutants bactériens *nnrS1*, *nnrS2* et *norB*

En 2012, il a été montré par notre équipe que des plantes de *M. truncatula* inoculées avec le mutant *hmp* possèdent des nodules qui entrent précocement en sénescence (Cam *et al.*, 2012). Nous avons analysé la sénescence des nodules induits par les mutants *nnrS1*, *nnrS2* et *norB*. La sénescence des nodules se caractérise macroscopiquement par l'apparition d'une coloration verte à la base des nodules. Ainsi, nous avons suivi le nombre de nodules sénescents au cours du temps pour chaque génotype (Figure 37). La figure 37A montre une illustration des nodules formés par les différentes souches ; ceux induits par les mutants *nnrS1*, *hmp* et *norB* présentent une base verte qui est inexistante chez les nodules sauvages et *nnrS2*. La figure 37B représente la cinétique d'apparition des nodules sénescents. Pour les plantes inoculées avec la souche WT, les premiers nodules sénescents apparaissent au bout de 25 jours. Nous observons que la cinétique d'apparition des nodules sénescents pour les plantes inoculées avec le mutant *norB* est comparable à celle observée pour les plantes inoculées avec la souche *hmp*. Les nodules induits par *nnrS1* ont une sénescence encore plus précoce que celle observée pour les souches *hmp* ou *norB*. En effet, dès 14 jours post-inoculation des nodules entrent en sénescence. Quant aux plantes inoculées avec le mutant *nnrS2*, la cinétique d'apparition des nodules sénescents est intermédiaire entre le WT et *hmp* ou *norB*. En effet, les nodules des plantes inoculées avec le mutant *nnrS2* entrent plus tôt en sénescence que ceux des plantes inoculées avec la souche WT mais plus tard que ceux des plantes inoculées avec les mutants *nnrS1* ou *hmp* ou *norB*. Pour conclure sur les résultats de cette expérience, nous avons observé une sénescence précoce des nodules induits par les 3 mutants (*nnrS1*, *nnrS2*, *norB*) par rapport à des nodules WT. Il est intéressant de faire le parallèle entre ces résultats et ceux obtenus lors de la quantification du NO dans les nodules (Figure 36). En effet, les premiers nodules à entrer en sénescence (plantes inoculées avec le mutant *nnrS1*) sont aussi ceux qui présentent l'augmentation la plus précoce de la quantité de NO. Inversement les nodules induits par *nnrS2* qui ont une sénescence plus tardive par rapport aux autres mutants, présentent l'augmentation de la quantité de NO la plus tardive. Par

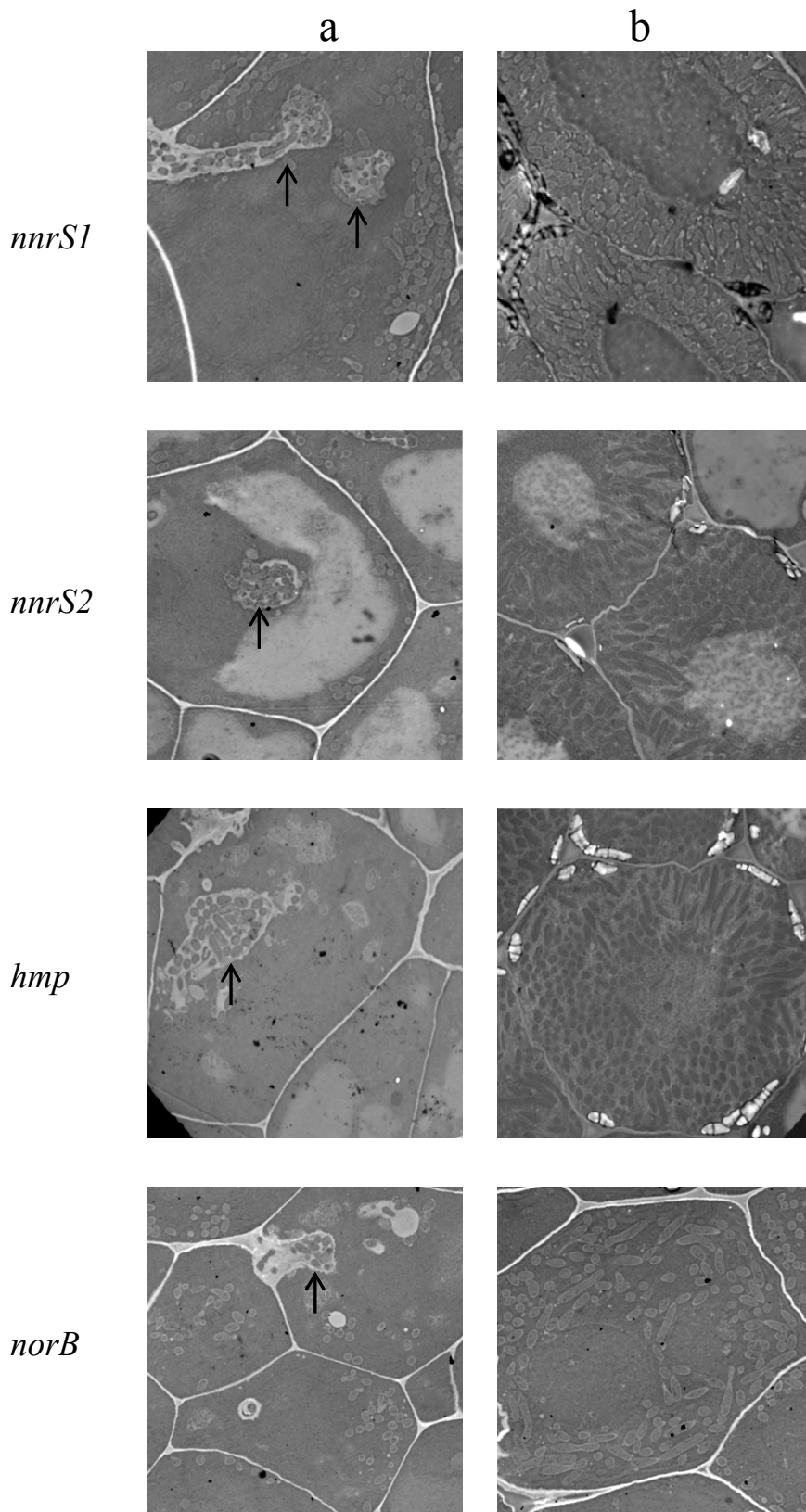


Figure 39: Observations de l'ultra-structure des nodules en microscopie électronique à transmission.

Des plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec les souches *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB*. 20 jours post-inoculation les nodules prélevés ont été coupés (70-80 nm) et observés en microscopie électronique à transmission. a- visualisation des cordons d'infection marqués par une flèche. b- visualisation des bactéries différenciées en bactéroïdes à l'intérieur des cellules végétales.

conséquent, il semble y avoir une corrélation entre NO et induction de la sénescence. Ceci confirme l'hypothèse avancée par l'équipe selon laquelle le NO serait un signal de l'induction de la sénescence des nodules.

Afin de mieux caractériser les phénotypes de sénescence observés pour les mutants, nous avons réalisé des observations microscopiques. Des coupes de nodules induits par les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB* et réalisées 20 jours post-inoculation ont été colorées avec du bleu de toluidine. Ce composé permet de révéler les structures hydrophobes et donne ainsi une image globale de la structure du nodule. La figure 38 représente les résultats de la coloration obtenue pour le WT, *nnrS1* et *nnrS2* (pour les nodules induits par les mutants *hmp* et *norB* nous avons fait les mêmes observations que pour les nodules induits par *nnrS1*). Comme attendu, à ce stade, les nodules WT ont une large zone III de fixation dépourvue de zone de sénescence. En revanche, pour les nodules induits par les mutants *nnrS1*, *hmp* et *norB* nous avons observé une large zone de sénescence à la base du nodule qui est caractérisée par une faible coloration. Les nodules élicités par *nnrS2* ne présentent pas de zone de sénescence franche; cependant à la base des nodules quelques cellules végétales plasmolysées ont été observées.

Les résultats de microscopie sont en accord avec le suivi macroscopique des nodules sénescents. Nous pouvons conclure que les nodules formés par *norB* présentent un profil de sénescence similaire à ceux induits par *hmp*. Par contre, les nodules induits par *nnrS1* présentent un phénotype de sénescence très prononcé avec l'apparition d'une zone de sénescence dès 14 jours post-inoculation. En revanche, pour les nodules élicités par *nnrS2*, l'apparition de la zone de sénescence n'est visible que plus tardivement vers 21 jours.

2) Les bactéries se différencient en bactéroïdes mais perdent leur viabilité dans les nodules formés par les mutants *nnrS1*, *hmp* et *norB*

Nous nous sommes demandé si les différentes étapes de la symbiose, notamment la libération des bactéries des cordons d'infection dans les cellules végétales et la différenciation des bactéries en bactéroïdes se produisent normalement dans les nodules induits par chacun des mutants. Pour tester cela, la microscopie électronique à transmission a été utilisée afin d'avoir accès à l'ultrastructure des nodules. Dans les nodules formés par une souche sauvage, les bactéries différenciées en bactéroïdes sont de grande taille et ont une forme allongée. La figure 39 représente les résultats obtenus pour les nodules induits par chacun des 4 mutants. Les images a) montrent que pour les 4 mutants, les bactéries sont normalement libérées des

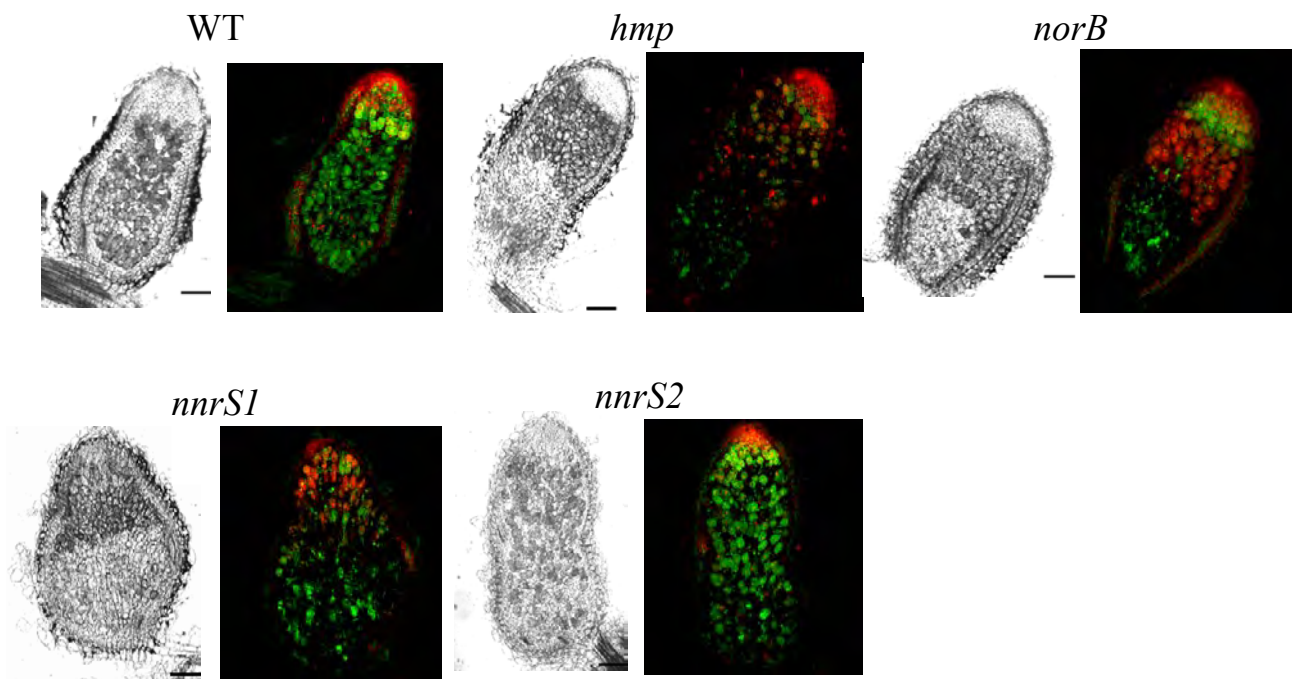


Figure 40: Test de viabilité des bactéroïdes.

Des plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* et *norB*. Pour tester la viabilité des bactéroïdes, 19 jours post-inoculation des coupes de nodules (60 μm) ont été colorées avec un mélange de deux fluorophores SYTO9 et Iodure de Propidium (IP). Les cellules contenant des bactéroïdes vivants sont colorées en vert par le SYTO9 et celles pourvues de bactéroïdes morts sont colorées en rouge par l'IP. Les images ont été obtenues par microscopie confocale et sont représentatives de 3 expériences. A gauche, les coupes de nodules observées en fond clair. La barre d'échelle correspond à 100 μm .

cordons d'infection. Par ailleurs, pour les 4 mutants, dans les cellules végétales, on observe des bactéries de forme allongées et de grande taille suggérant que les bactéries se différencient correctement en bactéroïdes (images b). En conclusion, la sénescence précoce des nodules formés par *nnrS1*, *hmp*, *norB* et *nnrS2* n'est liée ni à un défaut de libération des bactéries dans les cellules végétales ni à un défaut de différenciation des bactéries en bactéroïdes.

Nous avons ensuite analysé la viabilité des bactéroïdes en microscopie confocale en utilisant un mélange de deux fluorophores, le SYTO9 et l'Iodure de Propidium (IP) (Live and Dead probe) (Figure 40). Les cellules contenant des bactéroïdes vivants sont colorées en vert par le SYTO9 et celles pourvues de bactéroïdes morts sont colorées en rouge par l'IP. La coloration en rouge de la zone méristématique du nodule est due à une interaction aspécifique de la sonde. Les nodules WT et *nnrS2* fluorescent en vert sur la totalité du nodule indiquant que les bactéroïdes sont vivants. Comme déjà décrit (Cam *et al.*, 2012), une coloration rouge est observée pour les nodules formés par le mutant *hmp* suggérant la mort rapide des bactéroïdes dans les cellules végétales. Une observation similaire est réalisée pour les nodules induits par *norB*. Il est intéressant de noter que les nodules induits par *nnrS1* sont peu colorés et présentent une large zone sombre proximale probablement due au phénotype de sénescence plus prononcé. En effet, l'absence de coloration indiquerait une dégradation complète des bactéroïdes. De plus, la coloration verte résiduelle dans cette zone pourrait correspondre à la présence de bactéries saprophytiques (Zone V). Dans cette zone, les bactéries non différenciées libérées des cordons se multiplient dans les débris cellulaires du nodule avant de retourner dans le sol. En conclusion, seul un défaut de la viabilité des bactéroïdes est observé dans les nodules induits par les différents mutants.

3) Les plantes inoculées avec chacun des mutants présentent une diminution de la fixation d'azote corrélée à une réduction du développement des parties aériennes

Nous avons montré que le phénotype de sénescence précoce pour les plantes inoculées avec les mutants *nnrS1* se traduit par une diminution de l'activité de la nitrogénase. Nous avons mesuré cette activité par le test de réduction de l'acétylène (ARA) et la Figure 41A représente les résultats obtenus pour les plantes inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS1* pBBR *nnrS1*, WT pBBR *nnrS1*. Les plantes inoculées avec le mutant *nnrS1* présentent une réduction de plus de 40 % de l'activité nitrogénase par rapport aux plantes sauvages. L'ajout en *trans* du plasmide pBBR portant le gène *nnrS1* ne restaure que partiellement le phénotype

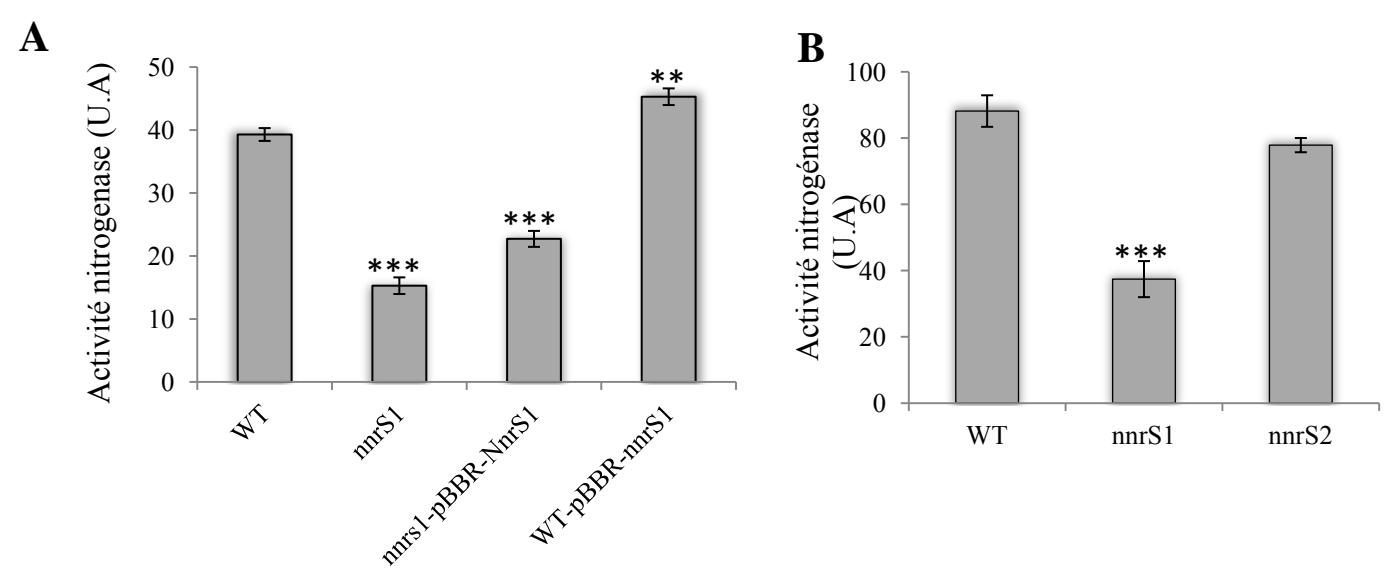


Figure 41: Mesure de l'activité nitrogénase par le test ARA. Le test ARA mesure l'activité de réduction de l'acétylène en éthylène par la nitrogénase bactérienne. Des plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *nnrS1-pBBR nnrS1* et *WT-pBBR nnrS1*. 29 jours après inoculation, les tubes contenant les plantes ont été fermés hermétiquement et 6 ml d'air ont été remplacés par de l'acétylène. Après 2 à 3 heures d'incubation à température ambiante, 0,2 ml de gaz sont prélevés à l'aide d'une seringue et injectés dans un chromatographe en phase gazeuse. La hauteur du pic d'éthylène est ensuite mesurée sur le chromatogramme. Le rapport entre la hauteur du pic d'éthylène et le temps d'incubation avec l'acétylène est calculé. Les barres correspondent à l'erreur standard. A- les valeurs présentées sur le graphe A correspondent à la moyenne des valeurs obtenues pour 2 expériences indépendantes, chacune comprenant 8 plantes par génotype. B- La valeur obtenue dans le graphe B correspond à une seule expérience et est la moyenne de 8 réplicats techniques. Les moyennes significativement différentes ont été détectées par un test Anova suivi d'un test de comparaison multiple de moyennes appelé test de Tukey. ** et *** indiquent une différence significative ($P < 0.01$ et $P < 0.001$ respectivement) par rapport au WT.

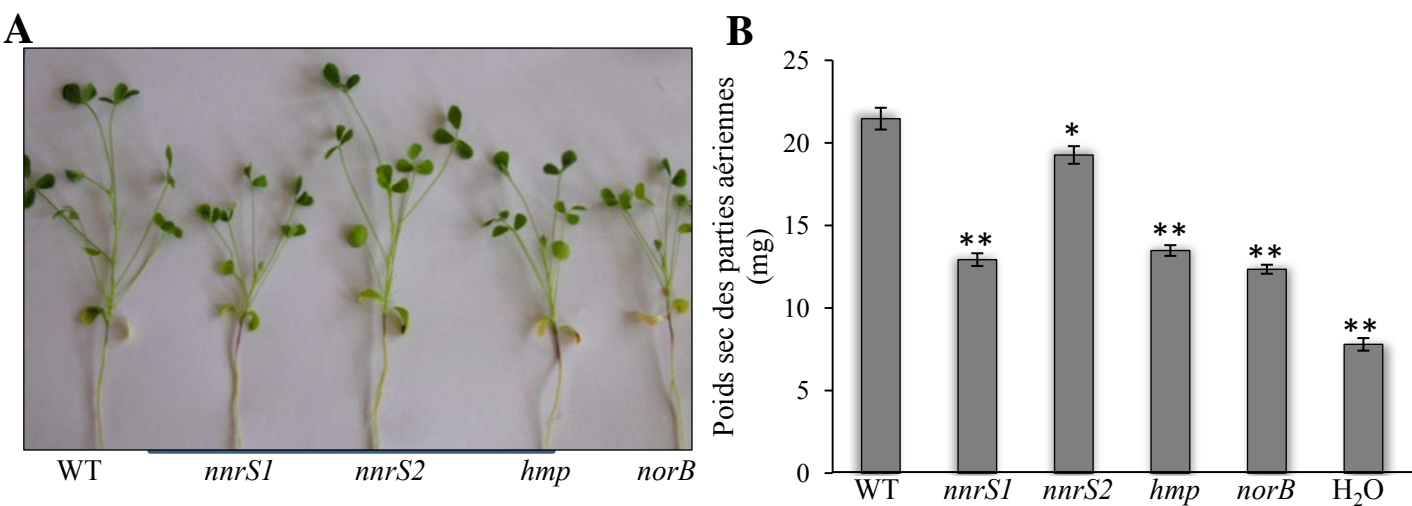


Figure 42: Mesure du poids sec des parties aériennes de *M. truncatula* inoculées avec différentes souches. Les plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp* ou *norB* ou non inoculées (H_2O). A- Visualisation des parties aériennes des plantes 38 jours post-inoculation. B- Mesure entre 38 et 40 jours après inoculation du poids sec des parties aériennes de 30 plantes par génotype bactérien. Le graphe correspond à la moyenne des poids secs pour chaque souche et les barres correspondent à l'erreur standard. * et ** indiquent une différence significative ($P < 0.05$ et $P < 0.01$ respectivement) par rapport au WT selon le test de student.

WT. Ceci pourrait s'expliquer par la faible stabilité du plasmide qui peut être perdu en absence de pression de sélection. Enfin, les nodules induits par une souche qui surproduit *nnrS1* (WT pBBR *nnrS1*) présentent une augmentation de l'activité nitrogénase. Pour les plantes inoculées avec le mutant *nnrS2*, il semble y avoir une légère diminution de l'activité nitrogénase par rapport à des plantes sauvages mais ce résultat nécessite d'être confirmé (Figure 41B).

La baisse de l'activité nitrogénase observée dans les nodules induits par *nnrS1* est à corréler avec une diminution du développement de la plante. La figure 42A montre clairement que les plantes inoculées avec les mutants *nnrS1* et *norB* présentent une forte diminution du développement de leurs parties aériennes à 38 jours post-inoculation, similaire aux plantes inoculées avec le mutant *hmp* (comme déjà montré par Cam *et al.*, 2012). Pour les plantes inoculées avec le mutant *nnrS2*, visuellement il n'y a pas de différence avec les plantes sauvages. Cependant, la mesure du poids secs de 30 plantes a révélé une différence significative entre les plantes inoculées avec la souche WT et celles inoculées avec le mutant *nnrS2* qui est d'autant plus importante pour les plantes inoculées avec les mutants *nnrS1*, *hmp* ou *norB* (Figure 42B).

4) La diminution de la quantité de NO en zone III du nodule suffit à retarder la sénescence

Le niveau de NO dans les nodules contrôle la mise en place de la sénescence. Afin de comprendre dans quelle zone du nodule le contrôle du niveau de NO est nécessaire pour réguler la sénescence nous avons entrepris une étude visant à réguler la quantité de NO dans une zone spécifique du nodule. Ainsi, dans un premier temps nous avons testé si la diminution de NO uniquement en zone III retarde la sénescence. Pour cela, nous avons fusionné la séquence codante du gène *hmp* avec le promoteur du gène *nifH*, noté pNifH qui est uniquement actif en zone III du nodule (Roux *et al.*, 2014). Le gène *nifH* code pour une sous-unité de la nitrogénase bactérienne. Cette construction appelée pNifH-*hmp* a été introduite dans le plasmide réplcatif pBBR MCS5. Le plasmide a été introduit dans une souche WT (notée WT pBBR pNifH-*hmp*) et *hmp* (notée *hmp* pBBR pNifH-*hmp*) permettant respectivement la surexpression d'*hmp* et l'expression d'*hmp* uniquement en zone III. Nous avons testé la construction de ces souches en analysant l'expression d'*hmp* dans les nodules induits par les souches WT pBBR vide, *hmp* pBBR vide, WT pBBR *hmp*, *hmp* pBBR *hmp*, WT pBBR pNifH-*hmp* et *hmp* pBBR pNifH-*hmp* (Figure 43, résultats préliminaires).

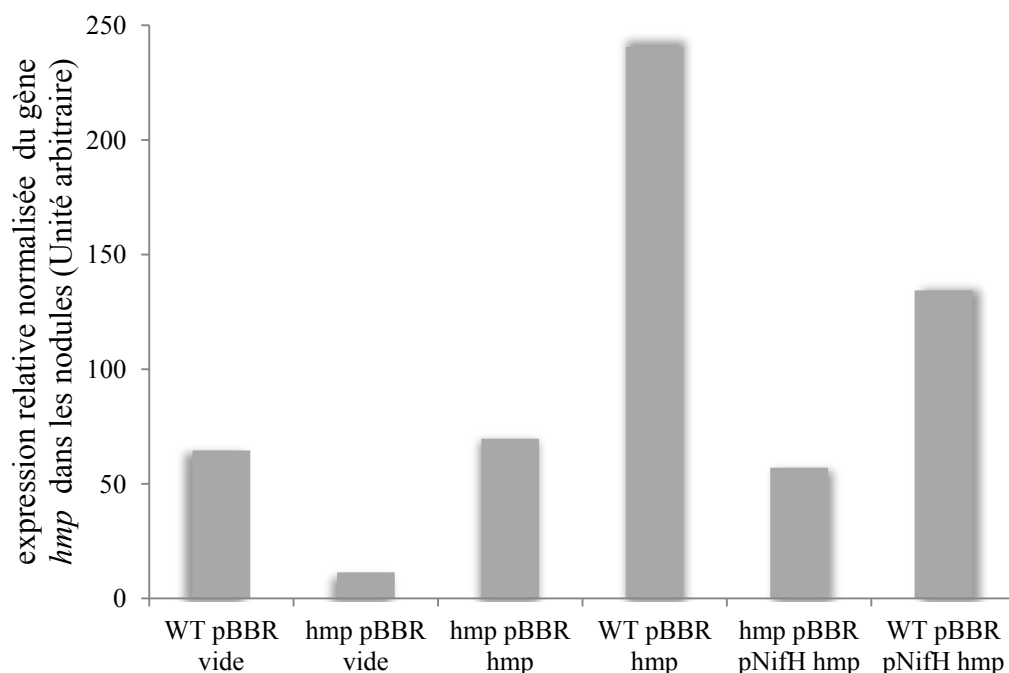


Figure 43: Mesure de l'expression d'*hmp* dans les nodules par RT qPCR

Des plantes ont été inoculées avec les souches WT pBBR vide, *hmp* pBBR vide, WT pBBR *hmp*, *hmp* pBBR *hmp*, WT pBBR pNifH-*hmp* et *hmp* pBBR pNifH-*hmp*. 23 jours post-inoculation, les nodules ont été récoltés. Après extraction des ARNs et traitement à la DNase, une RT qPCR avec des amorces complémentaires d'*hmp* a été réalisée avec le Light Cycler FastStart Reaction Mix MasterPLUS SYBR Green I (Roche) et le lightcycler (Roche) en suivant les instructions du fabricant. Pour normaliser les résultats, les ARNr 16S ont été utilisés comme référence. Le graphe correspond à une expérience (résultats préliminaires).

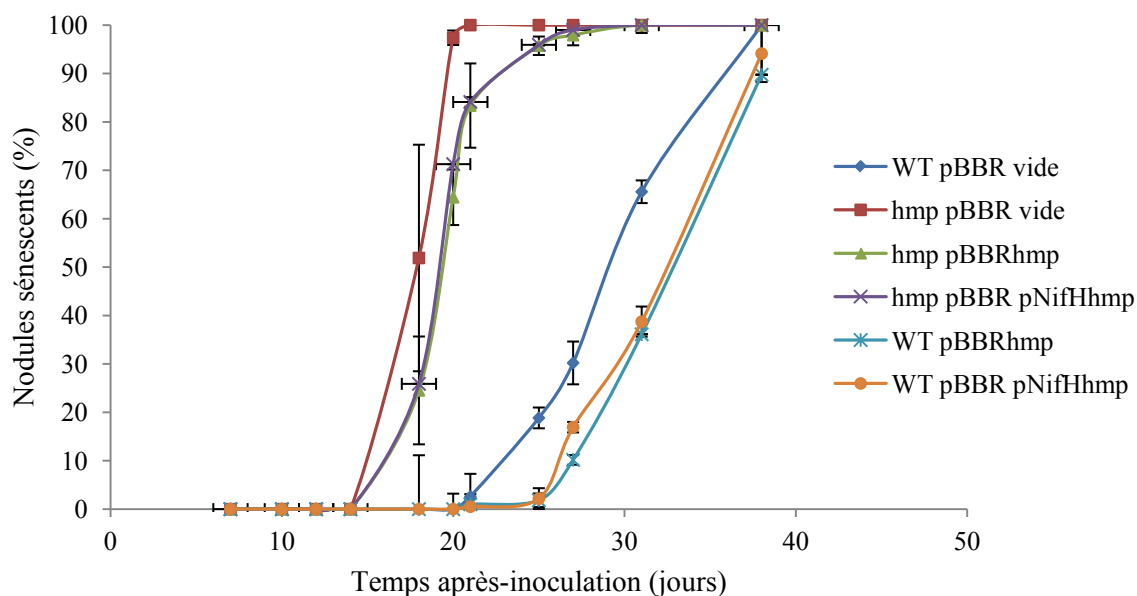


Figure 44: Cinétique d'apparition des nodules sénescents

Les plantes ont été inoculées avec les souches WT pBBR vide, *hmp* pBBR vide, *hmp* pBBR *hmp*, WT pBBR *hmp*, *hmp* pNifH *hmp* pBBR et WT pNifH *hmp* pBBR. Le nombre de nodules sénescents a été compté tous les 2 jours et est exprimé en pourcentage par rapport au nombre total de nodules. Un nodule a été considéré comme sénescents lorsqu'il présentait une base verte. Les données représentent la moyenne de 2 expériences indépendantes. Chaque expérience comporte une série de 10 plantes pour chaque génotype bactérien. Les barres correspondent aux erreurs standards.

L'expression d'*hmp* dans les nodules formés par la souche *hmp* pBBR pNifH-*hmp* est similaire à celle dans les nodules induits par la souche *hmp* pBBR *hmp*. Par ailleurs, nous avons observé une surexpression d'*hmp* dans les nodules formés par la souche WT pBBR pNifH-*hmp* par rapport aux nodules WT ; cependant cette surexpression est moins prononcée que dans les nodules WT pBBR *hmp*. Ces résultats bien que préliminaires permettent de valider la construction des différents plasmides et souches.

Nous avons ensuite suivi la sénescence des nodules (Figure 44). L'apport d'*hmp* en *trans* dans un mutant *hmp* (*hmp* pBBR *hmp*) ne complémente que faiblement le phénotype du mutant. Ceci peut s'expliquer par la faible stabilité du plasmide qui en absence de pression de sélection peut être perdu. Pour pallier au problème de stabilité du plasmide pBBRMCS5, il serait intéressant d'introduire les constructions dans un plasmide stable ou un plasmide intégratif. Néanmoins, il est intéressant de noter que la cinétique d'apparition des nodules sénescents pour les plantes inoculées avec la souche *hmp* pBBR pNifH-*hmp* est similaire à celle des plantes inoculées avec la souche *hmp* pBBR *hmp*. Ce résultat suggère que l'expression d'*hmp* uniquement en zone III est suffisante pour retarder la sénescence des nodules. Par ailleurs, les plantes inoculées avec la souche WT pBBR pNifH-*hmp* présentent une cinétique de sénescence des nodules identique à celle des plantes inoculées avec la souche WT pBBR *hmp*. En effet, pour les 2 génotypes, nous observons un retard d'environ 5 jours dans l'apparition des premiers nodules sénescents par rapport aux nodules WT. Ce résultat suggère que la diminution du niveau de NO uniquement en zone III du nodule retarde la mise en place de la sénescence. Il serait intéressant de faire les mêmes expériences en utilisant des promoteurs spécifiques de l'interzone II/III ou de la zone II. Un promoteur actif uniquement en zone II est celui du gène *rpoE2* qui code pour le régulateur majeur de la réponse générale au stress chez *S. meliloti*, objet d'une autre thématique de recherche de l'équipe (Sauviac *et al.*, 2007).

Le gène *hmp* s'exprime surtout en interzone II/III et *nnrS1*, *nnrS2* et *norB* principalement en zone III. L'absence de redondance fonctionnelle entre les protéines NnrS1, NnrS2, Hmp et NorB pourrait s'expliquer par des rôles zones-spécifiques de chacune de ces protéines. Ainsi l'utilisation de promoteurs zone-spécifiques permettrait de tester l'importance de chacune de ces protéines dans chaque zone du nodule. Pour l'instant, nous avons débuté l'étude en ne fusionnant que le gène *hmp* avec un promoteur actif uniquement en zone III. Les résultats suggèrent que Hmp joue un rôle important en zone III pour réguler la mise en place de la sénescence. Il serait intéressant de faire de même en fusionnant les gènes *nnrS1*, *nnrS2*

et *norB* avec le promoteur pNifH mais aussi avec des promoteurs actifs uniquement en zone II, où ces gènes sont principalement exprimés.

III) Etude de la tyrosine nitration de protéines bactériennes et végétales

A l'heure actuelle, la compréhension des modes d'action du NO dans la mise en place de processus biologiques reste un réel challenge. Chez les plantes et bactéries, les quelques études réalisées ont mis en évidence le rôle des modifications post-traductionnelles dépendantes du NO dans la régulation de voies métaboliques et dans la mise en place de réponses à des stress biotiques et abiotiques. On distingue 3 types de modifications post-traductionnelles de protéines dépendantes du NO ou d'un de ses dérivés : la métal-nitrosylation qui correspond à l'interaction du NO avec des centres métalliques contenus dans les protéines ; la S-nitrosylation qui est la liaison d'un NO au niveau d'un groupement thiol d'une cystéine et enfin la tyrosine nitration qui se caractérise par l'ajout d'un groupement nitro (NO₂) au niveau d'un groupe OH du noyau aromatique de la tyrosine.

Dans les symbioses fixatrices d'azote, seules quatre études récentes traitent de ces modifications dans les nodules. En 2012, Maiti et ses collaborateurs ont détecté la présence de protéines S-nitrosylées dans des nodules fonctionnels d'Arachide (Maiti *et al.*, 2012). En revanche, ils n'ont pas observé de niveau significatif de protéines tyrosine-nitratées dans ces nodules. Plus récemment, l'équipe d'Alain Puppo de Sophia Antipolis a identifié environ 80 protéines végétales et bactériennes S-nitrosylées dans les nodules de *M. truncatula* (Puppo *et al.*, 2013). Ces protéines sont principalement impliquées dans les métabolismes carboné et azoté et leur statut de protéines S-nitrosylées nécessite d'être confirmé. En 2015, dans les nodules de soja et de haricot, il a été montré que la leghémoglobine est nitratée au niveau d'une tyrosine localisée dans la cavité hémique (Sainz *et al.*, 2015). Cependant, aucun effet de cette modification sur l'activité de la protéine n'a été identifié. La seule étude qui a démontré l'effet d'une modification post-traductionnelle dépendante du NO sur l'activité d'une protéine dans les nodules symbiotiques est celle conduite par le groupe d'Helena Carvalho en 2011 (Melo *et al.*, 2011). En effet, cette équipe a montré que la glutamine synthétase (GS) végétale est inhibée par tyrosine nitration dans les nodules de *M. truncatula*. La GS est une enzyme clef de la symbiose puisqu'elle permet l'assimilation de l'azote par la plante en catalysant la transformation de l'ammonium en glutamine à partir de glutamate. Les auteurs ont proposé que l'inhibition de cette enzyme par tyrosine nitration serait nécessaire pour stimuler les mécanismes anti-oxydants du nodule puisque le substrat de la GS, le glutamate est aussi un

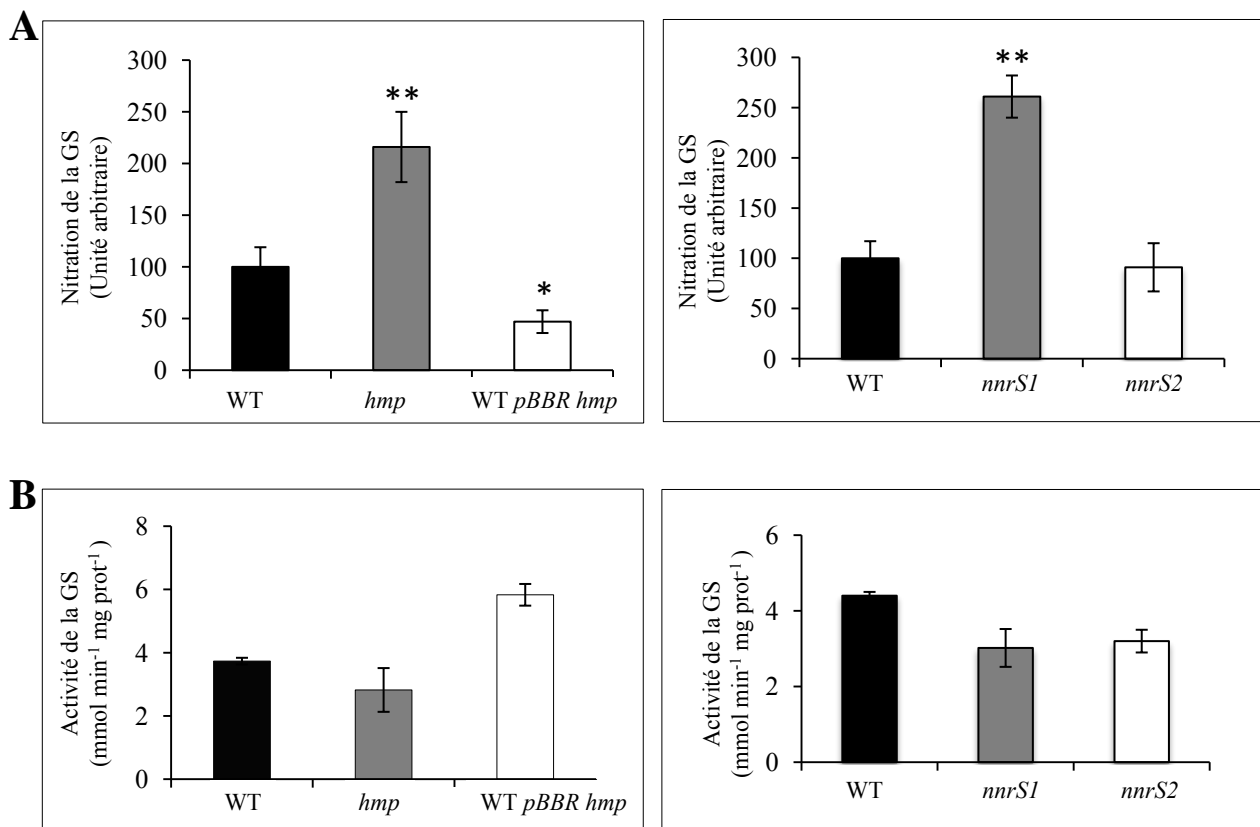


Figure 45: Evaluation de la tyrosine nitration et de l'activité de la GS dans les nodules induits par les souches WT, *nnrS1*, *hmp*, *nnrS2* et WT pBBR *hmp*

Les plantes de *M. truncatula* ont été inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *hmp*, *nnrS2* et WT pBBR *hmp* et les nodules ont été récoltés 3 semaines après inoculation. A- Quantification de la tyrosine nitration de la GS par un dérivé du test ELISA. Les valeurs obtenues pour chaque mutant sont exprimées en pourcentage des valeurs obtenues pour le WT. * et ** indiquent une différence significative ($P < 0.05$, $P < 0.01$ respectivement) par rapport au WT selon le test de Student. B- Activité de la GS déterminée par l'essai transférase. Les valeurs sur le graphe représentent les moyennes des valeurs obtenues pour 3 réplicats biologiques, chaque expérience étant faite en double et les barres correspondent aux erreurs standards.

précurseur de la formation de glutathion (GSH), un puissant anti-oxydant (Silva et Carvalho, 2013).

1) Les protéines bactériennes *NnrS1* et *Hmp* régulent la tyrosine nitration et l'activité de la GS végétale dans les nodules

Dans le but d'identifier le mécanisme à l'origine de l'induction de la sénescence des nodules, nous nous sommes demandé si la tyrosine nitration et l'inhibition de la GS n'étaient pas à l'origine de ce processus. Pour tester cette hypothèse, en collaboration avec l'équipe d'Helena Carvalho, nous avons quantifié la tyrosine nitration de la GS dans des nodules de *M. truncatula*, 3 semaines après inoculation des plantes avec les souches WT, *nnrS1*, *hmp*, *nnrS2* et WT pBBR *hmp* (Figure 45A). Les résultats montrent que la tyrosine nitration de la GS est environ 2 fois plus importante dans les nodules induits par les mutants *hmp* et *nnrS1* que dans les nodules WT. En revanche, les nodules élicités par une souche qui surexprime *hmp* (WT pBBR *hmp*) présentent une diminution de la quantité de GS tyrosine nitrée par rapport aux nodules WT. Quant aux nodules induits par le mutant *nnrS2*, le niveau de tyrosine nitration est comparable à celui des nodules WT ce qui est en accord avec le fait que 3 semaines après inoculation les nodules *nnrS2* ont un niveau de NO comparable à celui des nodules WT. La GS étant inhibée par tyrosine nitration (Melo *et al.*, 2011), nous avons étudié en parallèle l'activité de la GS et nous avons constaté qu'elle est diminuée dans les nodules induits par les mutants *nnrS1* et *hmp* et au contraire augmentée dans les nodules surexprimant *hmp* en comparaison avec des nodules WT (Figure 45B). L'ensemble de ces résultats démontre pour la première fois que des protéines bactériennes, en contrôlant le niveau de NO dans les nodules, agissent sur la régulation d'une protéine végétale par tyrosine nitration. Cependant, il est peu probable que la tyrosine nitration de la GS soit la principale cause de l'induction de la sénescence des nodules car des plantes transgéniques sous-exprimant la GS possèdent des nodules qui fixent moins bien l'azote mais qui sont dépourvus de signe de sénescence (H. Carvalho, Communication personnelle). Cependant, l'étude du transcriptome de nodules de *M. truncatula* a révélé que l'inhibition de la GS par le phosphinothricine conduit à l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la mise en place de la sénescence des nodules tels que les gènes codant pour les cystéines protéases (Seabra *et al.*, 2012). Ce résultat supporte l'idée que l'inhibition de la GS conduit à la mise en place de la sénescence. Une étude approfondie est nécessaire pour déterminer si l'inhibition de la GS par tyrosine nitration est à l'origine de l'induction de la sénescence des nodules.

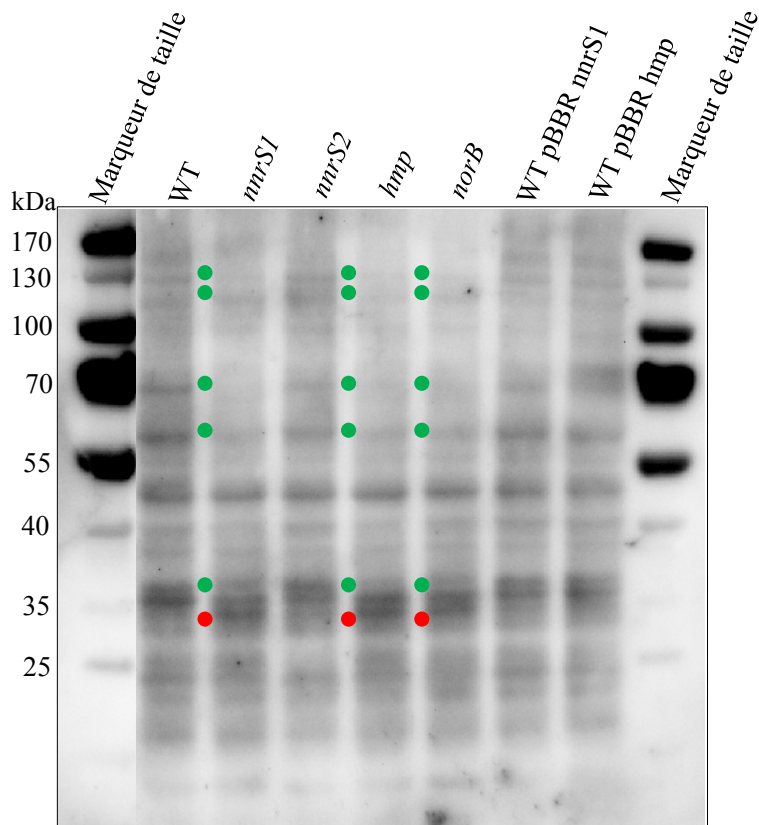


Figure 46: Profils des protéines tyrosine nitratées dans les nodules mutants et sauvages. Les plantes ont été inoculées avec les souches WT, *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp*, *norB*, WT pBBR *nnrS1* et WT pBBR *hmp* et les nodules ont été récoltés 20 jours après inoculation. Les protéines totales extraites des nodules ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane PVDF. Un Western blot anti-nitrotyrosine a ensuite été effectué. Les points verts correspondent aux bandes disparues et les rouges aux bandes apparues par rapport au profil obtenu pour les nodules occupés par la souche sauvage. Le profil est représentatif de 2 Western blot indépendants.

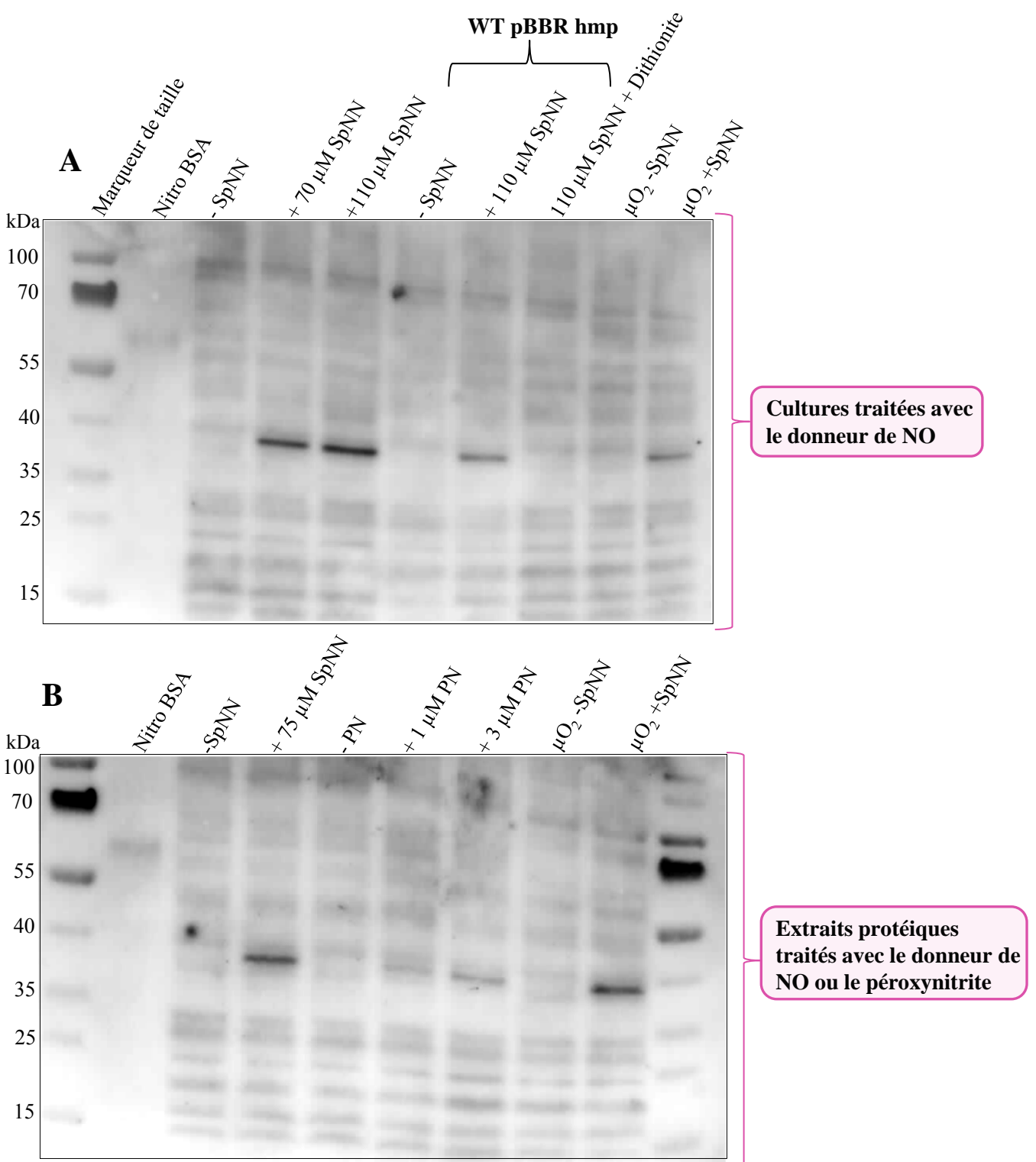


Figure 47: Profils des protéines solubles tyrosine nitrées de *S. meliloti*

Les cultures bactériennes ont été cultivées en phase exponentielle de croissance. A- Des cultures de bactéries WT ou WT pBBR *hmp* (surproduction de *hmp*) cultivées en conditions d'aérobies ou de microaérobies (μ O₂) ont été traitées pendant 1 heure avec le donneur de NO SpNN (70 ou 110 μ M). Les bactéries ont été lysées et les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Après transfert sur membrane PVDF, un Western blot anti-nitrotyrosine a été effectué. B- Les extraits protéiques d'une culture de bactéries WT cultivées en condition d'aérobies ou de microaérobies (μ O₂) ont été traitées pendant 1 heure avec le donneur de NO SpNN (75 μ M) ou le peroxyntrite (PN ; 1 ou 3 μ M). Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel SDS PAGE et après transfert sur membrane PVDF, un Western blot anti-nitrotyrosine a été effectué. Les profils sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

2) Mise en évidence de nouvelles protéines bactériennes et végétales tyrosine nitrées

Pour déterminer si l'accumulation de NO dans les nodules induits par les différents mutants entraîne une modification par tyrosine nitration d'autres protéines (végétales et/ou bactériennes) nous avons réalisé des profils de tyrosine nitration des protéines solubles de nodules mutants et sauvages par Western blot anti-nitrotyrosine (Figure 46). 20 jours après inoculation, les profils des protéines tyrosine nitrées obtenus pour les nodules élicités par les souches WT, *nnrS2*, WT pBBR *nnrS1* et WT pBBR *hmp* sont comparables. En revanche, les profils de tyrosine nitration obtenus à partir de nodules occupés par les souches *nnrS1*, *hmp* et *norB*, sont similaires entre eux mais différent sur plusieurs points par rapport aux nodules WT. En effet, plusieurs bandes disparaissent et une nouvelle bande apparaît autour de 33 kDa. Ces résultats suggèrent qu'en plus de la GS, il existe des protéines bactériennes et/ou végétales dont la tyrosine nitration est contrôlée indirectement par les protéines NnrS1, Hmp et NorB.

Nous avons fait le choix de nous focaliser sur les protéines bactériennes et avons simplifié le système en travaillant sur des bactéries en culture pour nous affranchir de la limitation en matériel biologique. Deux cultures de *S. meliloti* (WT et WT pBBR *hmp*) en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 1 heure avec différentes concentrations de donneur de NO (SpNN) et après extraction des protéines solubles, les profils des protéines tyrosines nitrées ont été visualisés par Western blot anti nitro-tyrosine (Figure 47A). La nitro-BSA commerciale sert de contrôle positif à l'expérience. Après traitement avec 70 μ M de SpNN, nous observons l'apparition d'une bande présentant une taille proche de 38 kDa et l'intensité de cette bande augmente après traitement de la culture bactérienne avec une plus forte concentration de donneur de NO (110 μ M de SpNN). Lorsque les bactéries surexpriment *hmp* (WT pBBR *hmp*), l'intensité de la bande diminue, ce qui suggère que l'apparition de cette bande est bien due au NO. Pour confirmer que cette bande est bien la conséquence de la tyrosine nitration d'une ou plusieurs protéines, nous avons traité les protéines avec du dithionite de sodium, un agent réducteur des tyrosine-nitrations. Nous avons observé la disparition de cette bande après un traitement avec 110 μ M de SpNN. En outre, il est à noter que les bandes de faible intensité visualisées en absence de SpNN correspondent à des interactions aspécifiques de l'anticorps avec des protéines puisqu'après traitement avec le dithionite de sodium elles sont toujours présentes.

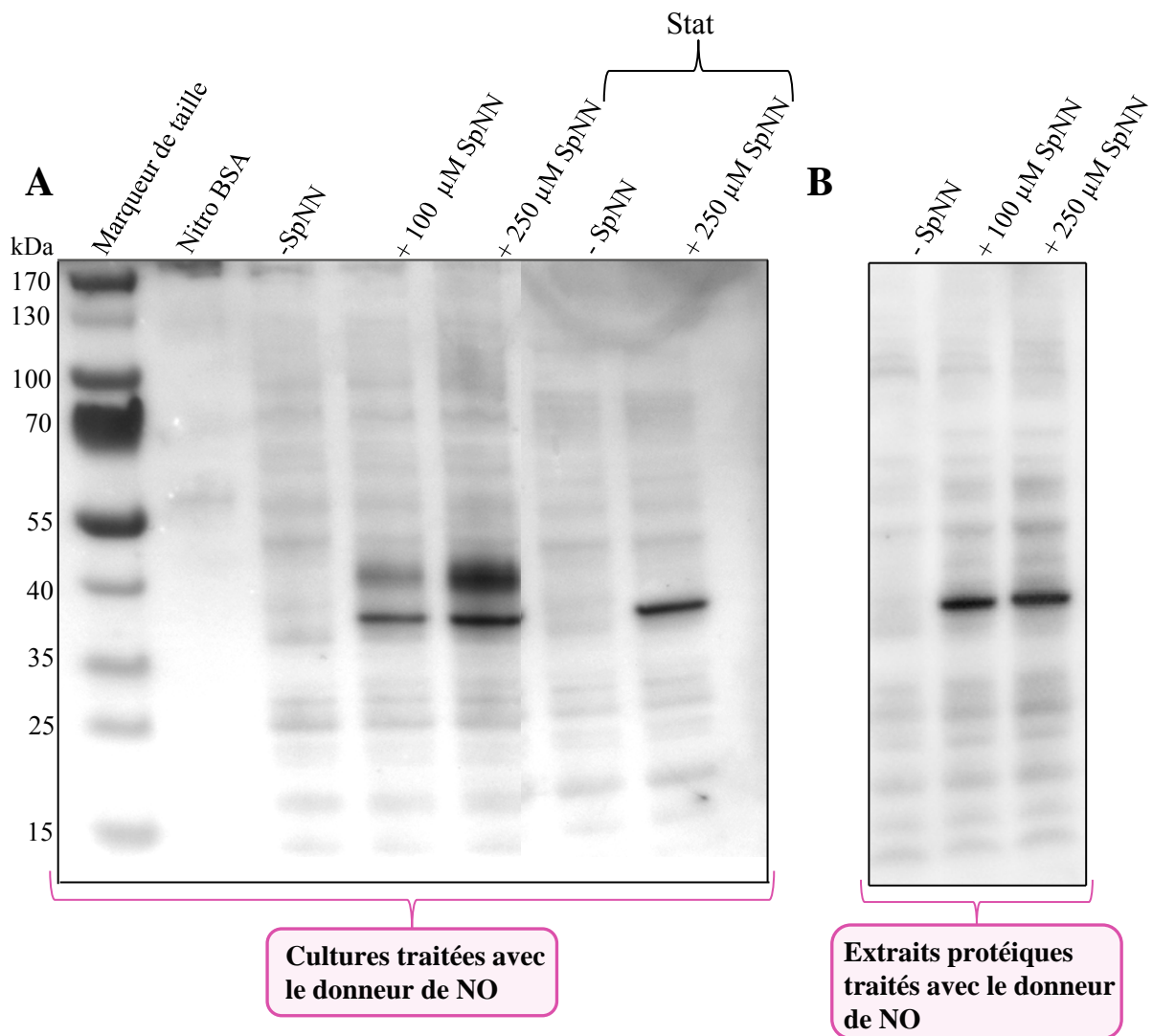


Figure 48: Profils des protéines solubles tyrosine nitrées de *S. meliloti*

A- Des cultures de bactéries WT en phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire (notées Stat) ont été traitées pendant 1 heure avec le donneur de NO SpNN (100 ou 250 μ M). Les bactéries ont été lysées et les protéines extraites ont été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE. Après transfert sur membrane, un Western blot anti-nitrotyrosine a été effectué. B- Les protéines extraites d'une culture de bactéries WT en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 1 heure avec le donneur de NO SpNN (100 ou 250 μ M). Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse sur un gel SDS PAGE et après transfert sur membrane, un Western blot anti-nitrotyrosine a été effectué.

Les profils sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

La microaérobie prévalant dans les nodules, nous avons testé si la bande de 38 kDa était toujours présente et si d'autres apparaissaient lorsque les bactéries étaient cultivées en microaérobie. Suite à un traitement avec la SpNN et en microaérobie, nous avons détecté la bande à 38 kDa. Cependant aucune nouvelle bande n'est apparue.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que suite à un traitement avec un donneur de NO, au moins une protéine soluble de *S. meliloti* est tyrosine nitrée. Dans le but de déterminer si cette protéine est néosynthétisée en présence de NO puis tyrosine nitrée, nous avons aussi réalisé un profil des protéines tyrosines nitrées mais cette fois ci en traitant non plus les cultures avec le donneur de NO, mais les protéines extraites (Figure 47B). Les protéines ont été traitées soit avec la SpermineNONOate (75 μ M) soit avec le peroxy-nitrite (1 et 3 μ M). Ce dernier qui est issu de l'association de l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et du NO serait le principal agent d'induction de la tyrosine nitration. Nous avons observé la présence de la bande d'environ 38 kDa suite au traitement avec la SpNN et le PN démontrant que cette protéine n'est pas néosynthétisée en présence de NO.

En renouvelant l'expérience, mais cette fois en traitant les cultures de bactéries avec une plus forte concentration de SpNN (250 μ M), nous avons observé une nouvelle bande plus diffuse autour de 42 kDa (Figure 48A). Ce résultat suggère qu'il existe au moins une deuxième protéine soluble tyrosine nitrée suite à l'ajout d'un donneur de NO dans le milieu de culture des bactéries. De façon intéressante, la bande est absente lorsque les bactéries ont été cultivées en phase stationnaire de croissance. Au cours de cette phase, les bactéries ont un métabolisme ralenti et synthétisent peu de protéines. Une hypothèse serait que cette deuxième protéine proche de 42 kDa soit néosynthétisée en présence de NO puis tyrosine nitrée. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé un profil des protéines tyrosines nitrées mais cette fois ci en traitant les protéines extraites avec le donneur de NO (Figure 48B). La bande n'est plus visible, seule celle de 38 kDa est présente. Par conséquent, la protéine (ou les protéines) contenue(s) dans la bande de 42 kDa est/sont néosynthétisée(s) en présence de NO, puis tyrosine nitrée(s).

Pour conclure, suite à un traitement avec un donneur de NO, au moins 2 protéines de *S. meliloti* sont tyrosines nitrées : une autour de 38 kDa qui n'est pas néosynthétisée en présence de NO et l'autre autour de 42 kDa qui est quant à elle néosynthétisée en présence de NO puis tyrosine nitrée.

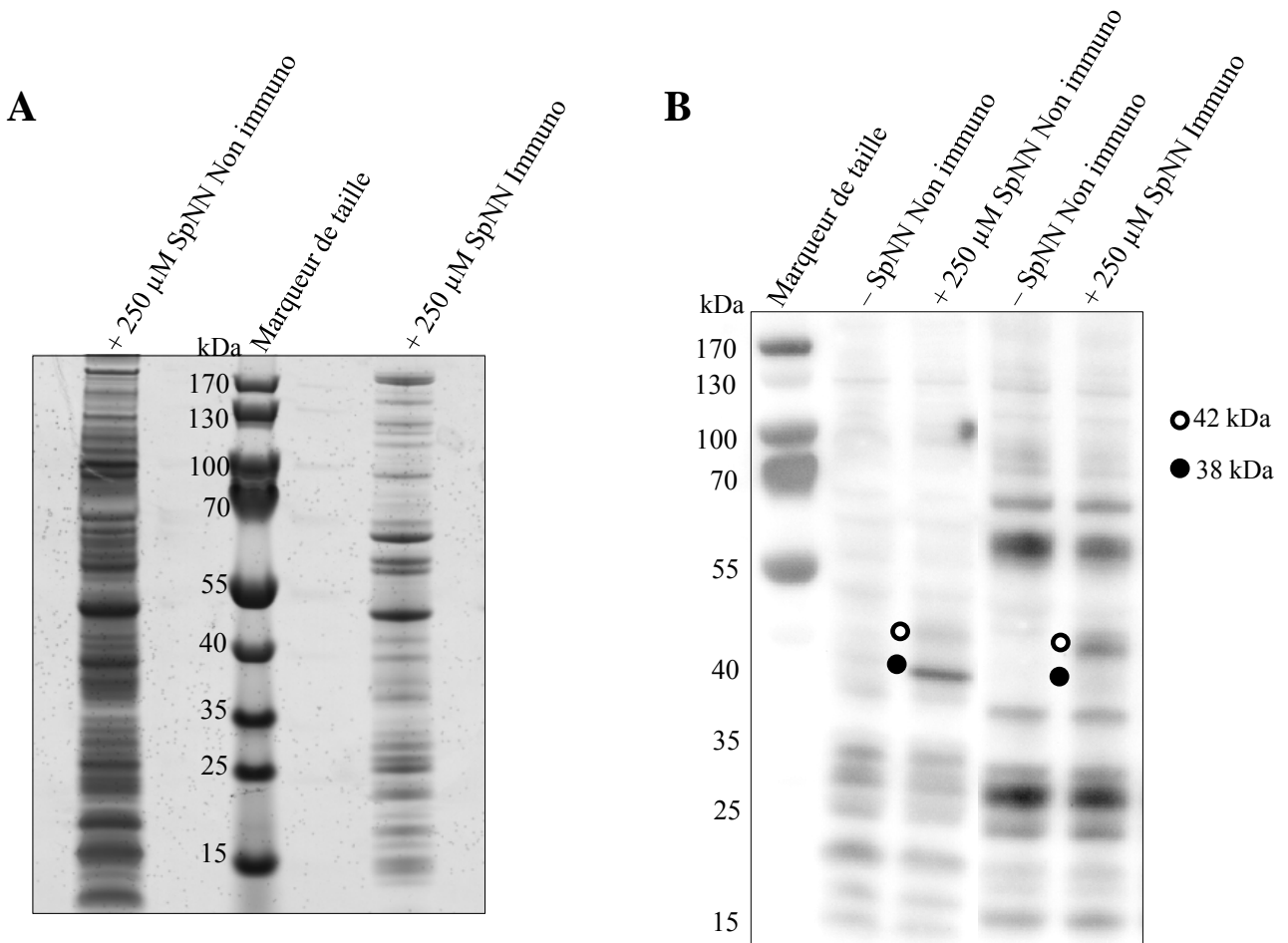


Figure 49: Immunoprécipitation des protéines tyrosine nitrées

Des cultures de bactéries WT en phase exponentielle de croissance ont été traitées ou non pendant 1 heure avec le donneur de NO (SpNN 250 μ M). Les protéines extraites ont été immunoprécipitées à l'aide de billes couplées à un anticorps monoclonal anti tyrosines nitrées. Les protéines ont ensuite été séparées par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE. A- Coloration au bleu de coomassie du gel SDS-PAGE. B- Après transfert sur membrane, un Western blot anti-nitrotyrosine a été effectué sur des échantillons protéiques immunoprécipités ou non.

3) *Vers l'identification par spectrométrie de masse des protéines bactériennes tyrosine nitratées*

Nous avons voulu par la suite déterminer l'identité des protéines contenues dans les bandes autour de 38 et 42 kDa. Pour une protéine donnée, seule une faible proportion de protéines est tyrosine nitrée (environ 1 %). Ainsi, la stratégie utilisée a d'abord été d'enrichir les protéines tyrosine-nitrées par immunoprécipitation puis de les identifier par spectrométrie de masse. L'immunoprécipitation est basée sur l'utilisation de billes couplées à un anticorps monoclonal anti nitro-tyrosine et a été réalisée sur des extraits protéiques issus d'une culture WT traitée ou non avec 250 μ M de SpNN. La figure 49A représente un gel coloré au bleu de coomassie après immunoprécipitation ou non des extraits protéiques bactériens traités avec 250 μ M de SpNN. Ce gel a permis de vérifier que le protocole d'immunoprécipitation utilisé est fonctionnel puisque l'extrait protéique immunoprécipité est moins complexe. Un Western blot anti nitro-tyrosine réalisé sur les échantillons immunoprécipités nous a permis de montrer que l'immunoprécipitation n'a permis d'enrichir que la bande autour de 42 kDa ; la bande de 38 kDa n'étant pas retrouvée dans la ligne « +250 μ M SpNN Immuno ». Un défaut d'accessibilité du site de tyrosine nitration à l'anticorps pourrait expliquer que cette protéine n'ait pas pu être immunoprécipitée.

Pour identifier les protéines tyrosines nitrées contenues dans la bande de 42 kDa, après immunoprécipitation des protéines tyrosine-nitrées, nous avons découpé la zone de 42 kDa sur le gel de coomassie. N'ayant pas réussi à immunoprécipiter la ou les protéine(s) contenues dans la bande à 38 kDa, sur le gel de coomassie nous avons découpé la zone de 38 kDa en absence d'immunoprécipitation. Ces 2 zones ont été prélevées soit en condition de traitement avec le donneur de NO soit en absence. Ainsi 4 échantillons ont été analysés en spectrométrie de masse par la plateforme protéomique de Toulouse. Pour chacune des 4 bandes prélevées, une centaine de protéines de *S. meliloti* ont été identifiées mais aucun spectre correspondant à des tyrosines nitrées n'a été mis en évidence. Néanmoins, de ces listes, nous avons extrait une quinzaine et une trentaine de protéines putativement tyrosine-nitrées pouvant correspondre respectivement à la bande à 42 et 38 kDa (Figure 50). En effet, pour la bande de 42 kDa nous avons sélectionné uniquement celles qui ont une taille comprise entre 35 et 45 kDa et qui sont absentes dans l'échantillon non traité avec le donneur de NO (puisque'elle est néosynthétisée en présence de NO puis tyrosine nitrée) et pour la bande de 38 kDa nous avons retenu les protéines dont la taille est comprise entre 31 et 45 kDa et qui sont retrouvées dans l'échantillon non traité avec le NO (puisque'elle n'est pas néosynthétisée

| Accession | Nom de la protéine | Prédiction Tyrosine nitration (iNitro-Tyr) | Nombre de sites putatifs |
|------------------------|--|--|--------------------------|
| Bande de 42 kDa | | | |
| SMb21461 | Conserved hypothetical protein | Oui | 3 |
| cysN-SMc00090 | Probable fructose-bisphosphate aldolase class I | Oui | 4 |
| SMc00876 | Probable phosphopentomutase | Oui | 3 |
| trkA-SMc01046 | Transposase for insertion sequence element ISRm3 | Oui | 4 |
| phoH-SMc01114 | Putative O-acetylhomoserine sulphydrylase | Oui | 2 |
| SMc01625 | Oxidoreductase | Non | |
| SMc01809 | Putative polyol ABC transporter, ATP-binding | Non | |
| gltA-SMc02087 | Putative MRP protein homolog ATP-binding | Oui | 11 |
| rkpJ-SMc02269 | Citrate synthase | Oui | 4 |
| prfA-SMc02436 | Putative sugar uptake ABC transporter | Oui | 2 |
| TRm3-SMc02839 | Putative sulfate adenylate | Oui | 2 |
| SMc03132 | Probable peptide chain release factor I | Oui | 2 |
| fbaB-SMc03983 | Capsule polysaccharide export protein | Oui | 2 |
| deoB-SMc04119 | Putative phosphate starvation-inducible protein PhoH | Non | |
| SMc04402 | NADH-quinone oxidoreductase subunit F I | Non | |
| | | | |
| Bande de 38 kDa | | | |
| | | | 2 |
| SMA1811 | conserved hypothetical protein | Oui | 1 |
| SMA2361 | conserved hypothetical protein | Oui | 1 |
| SMb20368 | Putative secretion protein, hlyD family | Oui | 1 |
| SMb20856 | Putative deoxyribose ABC transporter | Oui | 1 |
| SMb20875 | Conserved hypothetical protein | Oui | 7 |
| exoB-SMb20942 | UDP glucose 4-epimerase | Oui | 3 |
| SMb20981 | Putative C4-dicarboxylate transporter | Oui | 2 |
| cysD-SMc00091 | Putative sulfate adenylate transferase subunit 2 cysteine biosynthesis protein | Oui | 4 |
| SMc00105 | Probable alcohol dehydrogenase | Oui | 1 |
| hemF-SMc00180 | Probable coproporphyrinogen III oxidase | Oui | 1 |
| gshB1-SMc00419 | Putative glutathione synthetase | Oui | 1 |
| accA-SMc00690 | Probable acetyl-coenzyme A carboxylase | Oui | 3 |
| SMc00700 | Probable aerobic cobaltochelatase | Oui | 6 |
| lpsC-SMc01222 | Lipopolysaccharide core biosynthesis glycosyl transferase | Oui | 1 |
| SMc01324 | Sugar epimerase | Oui | 4 |
| hflC-SMc01440 | Putative hydrolase serine protease | Oui | 3 |
| SMc01966 | Putative spermidine/putrescine-binding | Oui | 4 |
| SMc02378 | Putative glycine betaine ABC transporter, periplasmic | Oui | 4 |
| SMc02451 | Conserved hypothetical protein | Oui | 1 |
| SMc02565 | Hypothetical protein | Oui | 2 |
| nadC-SMc02598 | Probable nicotinate-nucleotide | Non | |
| prs-SMc02686 | Probable ribose-phosphate pyrophosphokinase | Non | |
| SMc02708 | Conserved hypothetical protein | Oui | 2 |
| SMc02712 | Hypothetical protein | Oui | 2 |
| parB-SMc02801 | Probable chromosome partitioning protein | Oui | 2 |
| pheA-SMc02899 | Putative prephenate dehydratase | Oui | 4 |
| SMc02903 | Putative nudix hydrolase family protein | Oui | 1 |
| flaA-SMc03037 | Flagellin A | Oui | 1 |
| SMc04043 | Conserved hypothetical protein | Oui | 3 |
| smoM-SMc04251 | Probable periplasmic mannitol-binding | Oui | 2 |

Figure 50: Liste des protéines potentiellement tyrosine nitrées contenues dans les 2 bandes. Les colonnes 3 et 4 représentent les résultats obtenus en utilisant un logiciel de prédiction des tyrosines nitrées iNitro-Tyr.

en présence de NO). La plupart de ces protéines sont impliquées dans le métabolisme carboné et dans le transport des sucres. Parmi elles, la protéine fructose biphosphate aldolase qui est une enzyme de la glycolyse a déjà été identifiée comme étant tyrosine nitratée lors de la mise en place des réactions de défense chez *A. thaliana* (Cecconi *et al.*, 2009). Par ailleurs, en utilisant le logiciel de prédiction des tyrosines nitratées iNitro-Tyr, nous avons regardé si chacune des protéines de la liste est putativement tyrosine nitratée et si oui le nombre de sites potentiel (3ème et 4ème colonne Figure 50, Xu *et al.*, 2014). Seules 6 protéines ne sont pas prédites pour être tyrosine nitratées. Parmi celles prédites pour être tyrosine nitratées, le nombre de sites putatifs varie entre 1 et 11 ; notamment les protéines codées par les gènes *gltA*, *SMc00700* et *SMb20875* sont prédites pour présenter respectivement 11, 6 et 7 tyrosines nitratables. La protéine fructose biphosphate aldolase est prédite pour présenter 4 sites de tyrosine nitration. De plus, nous avons comparé cette liste de protéines potentiellement tyrosine-nitratées avec la liste des gènes de *S. meliloti* induits par le NO (Meilhoc *et al.*, 2010) mais aucun gène commun n'est retrouvé. Cette liste est un premier point de départ pour essayer d'identifier les protéines contenues dans les bandes à 38 et 42 kDa. Une idée serait d'utiliser des mutants perte de fonction des gènes de cette liste et de tester par Western blot anti nitrotyrosine si les bandes sont toujours présentes suite à un traitement des cultures avec un donneur de NO. Si dans un mutant une des 2 bandes est absente alors la protéine contenue dans la bande est probablement codée par le gène muté.

La proportion de tyrosine nitration d'une protéine donnée est faible, par conséquent l'étape limitante lors de l'identification des protéines tyrosine nitratées en spectrométrie de masse est celle de l'enrichissement des protéines tyrosine nitratées. Ainsi, nous essayons de développer une nouvelle méthode d'enrichissement des protéines tyrosine nitratées basée sur les gels bidimensionnels.

Jusqu'à présent, nous nous sommes intéressés uniquement aux protéines solubles de *S. meliloti* tyrosines nitratées suite à un ajout d'un donneur de NO dans le milieu de culture. Ces protéines proviennent du surnageant obtenu après la lyse des bactéries. Nous avons aussi réalisé un profil des protéines non solubles tyrosines nitratées provenant du culot (Figure 51). Nous avons observé l'apparition de 7 nouvelles bandes suite au traitement avec 250 et 500 μ M suggérant que d'autres protéines sont tyrosines nitratées et restent à identifier.

En conclusion, nous avons montré que les protéines bactériennes NnrS1 et Hmp, en contrôlant le niveau de NO dans les nodules, régulent l'activité de la glutamine synthétase

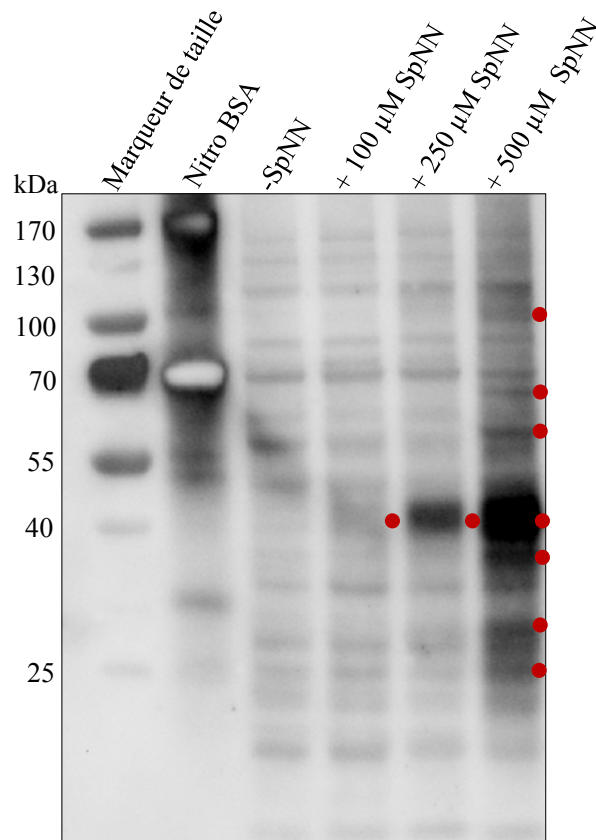


Figure 51 : Profils des protéines non solubles tyrosines nitratées de *S. meliloti* traitée avec un donneur de NO (SpNN)

Une cultures bactérienne WT cultivée en phase exponentielle de croissance a été traitée pendant une heure avec différentes concentrations de donneur de NO, SpNN (100, 250 et 500 μM). Après lyse des bactéries, les protéines du culot ont été resuspendues et déposées sur gel SDS-Page. Après transfert sur membrane, un Western blot anti-nitrotyrosine a été effectué. Les points rouges indiquent les bandes apparues.

végétale qui est une enzyme clé de la symbiose. Nous avons montré que NnrS1, Hmp et NorB contrôlent indirectement la tyrosine nitration d'autres protéines du nodule. Pour l'instant nous nous sommes surtout intéressés aux protéines bactériennes et nous tentons d'identifier les protéines bactériennes tyrosine nitrées suite à un traitement des cultures avec un donneur de NO.

DISCUSSION

I) Fonction de NnrS1 et NnrS2 de S. meliloti

Le NO est une molécule gazeuse impliquée dans de nombreux processus biologiques chez les plantes, du développement aux réponses aux stress abiotiques ou biotiques. Au cours des interactions plante-pathogène, le NO fait partie de l'arsenal de défense de l'hôte. En réponse, les pathogènes ont développé des mécanismes pour contrer les effets du NO. Dans la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse modèle *M. truncatula* et la bactérie *S. meliloti*, du NO a été détecté durant toutes les phases de l'interaction. L'équipe avait précédemment montré que la réponse de *S. meliloti* au NO est nécessaire au maintien de la symbiose. En effet, des nodules formés par une souche mutée dans le gène *hmp* (le gène *hmp* est induit par le NO et code pour une protéine qui dégrade le NO) sénescent prématurément.

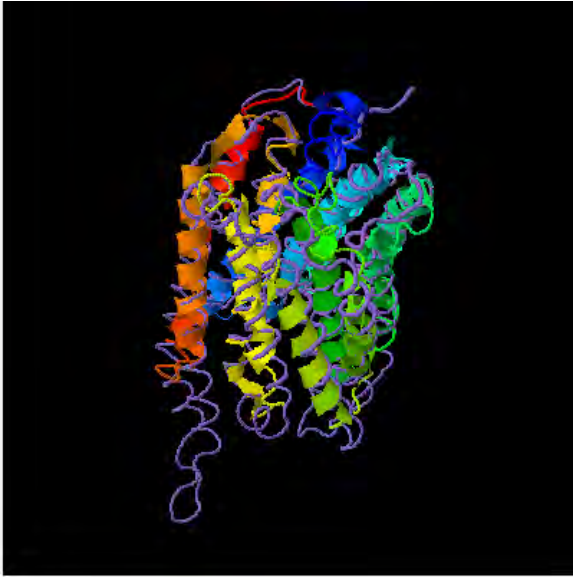
Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la caractérisation de 2 nouveaux gènes de *S. meliloti* induits par le NO, *nnrS1* et *nnrS2*. Précédemment, il a été montré que la protéine NnrS est impliquée dans la résistance au NO de *Vibrio cholerae* et de *Neisseria meningitidis* (Stern *et al.*, 2013 ; Jamet *et al.*, 2013). Chez *S. meliloti*, nous avons montré que ces protéines participent à la résistance au NO en culture. Une hypothèse envisagée serait que NnrS1 et NnrS2 participent à la dégradation du NO. Nous avons testé cette hypothèse en utilisant 2 approches complémentaires. La première est basée sur l'utilisation d'un analyseur de NO qui mesure la quantité de NO présente dans une culture bactérienne. La deuxième méthode est basée sur la quantification du NO dans des cultures en utilisant des souches contenant le biosenseur du NO qui est une fusion transcriptionnelle entre un promoteur induit par le NO et le gène codant pour la β -galactosidase. Les 2 approches ont montré que NnrS1 et plus minoritairement NnrS2 participent directement ou indirectement à la dégradation du NO en culture.

La protéine NnrS appartient à la famille des HCO (Heme-copper oxidase). Initialement cette famille comprenait 2 sous-classes : les oxydases respiratoires et les NO réductases. La sous-unité catalytique des HCO consiste en une structure cœur contenant 12 domaines transmembranaires et 6 histidines conservées permettant la liaison à des groupements hèmes et des métaux (Pei *et al.*, 2014). Néanmoins, les NOR et les oxydases

respiratoires diffèrent sur 3 points : i) le site catalytique des NOR contient un atome de fer alors que c'est un atome de cuivre chez les oxydases respiratoires ii) les NOR ne sont pas capables de transloquer les protons iii) les oxydases respiratoires présentent une tyrosine conservée au niveau du site catalytique qui est nécessaire pour la réduction de l'oxygène. Plus récemment, des protéines homologues aux HCO appelées HCOH de fonction inconnue ont été identifiées et classées dans la famille des HCO. C'est le cas de la protéine NnrS qui contient 12 domaines transmembranaires, 2 histidines conservées et qui lie un groupement hème. Nous avons donc émis l'hypothèse que NnrS1 et NnrS2 possèdent une activité NO réductase ; cette dernière catalyse la réduction de deux molécules de NO en une molécule de N₂O. Pour tester cette hypothèse, nous avons couplé 2 méthodes ; une approche biochimique qui permet de doser une activité de réduction du NO dans des cultures bactériennes et une approche en chromatographie en phase gazeuse qui détermine la quantité de N₂O produit par les cultures bactériennes. En contrôle, nous avons réalisé les expériences avec un mutant du gène *norB* qui code pour une NO réductase dont l'activité de réduction du NO est démontrée chez plusieurs bactéries (Cramm *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2012). Les résultats attendus avec cette souche sont une activité de réduction du NO diminuée et moins de N₂O produit par rapport à une souche WT. Nous avons montré que l'activité de réduction du NO d'une culture bactérienne *norB* est diminuée par rapport à une souche WT. Cependant, de façon surprenante, la quantité de N₂O dosée dans une culture de mutant *norB* est similaire à celle dosée dans une culture de la souche WT. Ceci peut s'expliquer de 2 façons : l'existence de systèmes de compensation, qui en absence de NorB seraient activés en culture, ou bien la méthode de dosage de N₂O, qui ne serait pas suffisamment sensible pour détecter une différence avec la souche WT. Cette dernière hypothèse est à privilégier puisque la mutation de *norB* entraîne une diminution de l'activité de réduction du NO par rapport à une souche WT, par conséquent il ne semble pas y avoir la mise en place de systèmes compensatoires. De façon intéressante, les mutants *nnrS1* et *nnrS2* se comportent comme un mutant *norB*. Par ailleurs, la surexpression de *nnrS1* augmente la production de N₂O et accentue l'activité de réduction du NO suggérant que NnrS1 possède une activité NO réductase.

Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les protéines NnrS soient impliquées dans un autre processus que la dégradation du NO. En effet, chez *Vibrio cholerae*, il a été montré que NnrS ne participe pas à la dégradation du NO mais protège les protéines des dommages causés par le NO (Stern *et al.*, 2013). De plus, chez *S. meliloti*, le gène *nnrS2* est organisé en opéron avec *sma1195* qui code pour une protéine homologue à YtfE d'*E. coli*

NnrS1



NnrS2



Figure 52: Homologies de structure entre NnrS1 et NnrS2 et la cytochrome oxydase cbb3: Utilisation du logiciel I-TASSER. Les structures de NnrS1 et NnrS2 ont été prédites en utilisant le logiciel I-TASSER et ont été comparées avec des structures connues de protéines. La structure la plus proche de NnrS1 et NnrS2 correspond à celle de la cytochrome oxydase cbb3 de *Pseudomonas stutzeri*.

Les hélices de différentes couleurs représentent les 12 domaines transmembranaires des protéines NnrS1 et NnrS2. La structure violette correspond à celle de la cytochrome oxydase cbb3 de *Pseudomonas stutzeri*.

; cette dernière est impliquée dans la réparation des clusters fer-soufre endommagés par le NO. Par ailleurs, en utilisant un logiciel bioinformatique permettant de classer les HCO, NnrS1 et NnrS2 ont été classées parmi les oxydase respiratoires (Sousa *et al.*, 2011). En effet, ces 2 protéines présentent plus de similarités avec les oxydases respiratoires qu'avec les NOR puisqu'elles possèdent un atome de cuivre et une tyrosine au niveau du site catalytique et auraient une structure secondaire prédite pour transloquer les protons. En outre, en utilisant I-TASSER qui est un logiciel de prédiction de structure et fonction de protéines, les structures de NnrS1 et NnrS2 sont prédites proches de celle de la cytochrome oxydase cbb3 de *Pseudomonas stutzeri* (Figure 52 ; Yang and Zhang, 2015). Il est probable que NnrS1 et NnrS2 soient des oxydases respiratoires qui possèdent aussi une activité NO reductase. Cette double activité a déjà été décrite chez 2 autres bactéries. En effet, chez *Pseudomonas stutzeri* il a été montré que la cytochrome oxydase cbb3 possède une activité NO réductase, et chez *Thermus thermophilus*, les 2 oxydases respiratoires terminales ba₃ et caa₃ sont capables de réduire le NO en N₂O en condition d'anaérobie (Forte *et al.*, 2001 ; Giuffrè *et al.*, 1999). Une hypothèse que l'on peut émettre est qu'en aérobie, NnrS a une activité de réduction de l'oxygène et qu'en condition de carence en oxygène, pour maintenir un niveau énergétique suffisant, NnrS est capable de réduire le NO. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de doser l'activité de réduction de l'oxygène des cultures sauvage et mutantes (*nnrS1* et *nnrS2*) en aérobie et microaérobie. Pour cela, une méthode classiquement utilisée est de déterminer la vitesse d'oxydation d'un substrat de l'oxydase respiratoire, le ferrocyclochrome par spectrophotométrie.

II) Les nodules formés par les mutants *nnrS1*, *nnrS2* et *norB* accumulent du NO et sénescent prématurément

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons étudié la conséquence de la mutation des gènes *nnrS1*, *nnrS2* ou *norB* sur le processus symbiotique. Nous avons montré que les plantes inoculées avec chacun des mutants présentent des nodules qui accumulent du NO et qui sénescent prématurément. Ce phénotype avait déjà été observé par l'équipe puisque des nodules formés par le mutant *hmp* (le gène *hmp* code pour une flavohémoglobine qui dégrade le NO) accumulent du NO et sénescent précocement (Cam *et al.*, 2012). Par ailleurs, nous avons montré que selon le mutant bactérien considéré, l'accumulation de NO dans les nodules est plus ou moins précoce. Ainsi, les nodules formés par *nnrS1* accumulent précocement du NO dès 14 jours post-inoculation, les nodules induits par *norB* ou *hmp* accumulent du NO à

19 jpi et ce n'est qu'à 26 jpi que les nodules élicités par *nnrS2* montrent une accumulation de NO. De façon intéressante, nous avons montré qu'il y a une corrélation entre le niveau de NO et l'induction de la sénescence. Ainsi, les nodules qui présentent une accumulation précoce de NO (plantes inoculées avec *nnrS1*) sont les premiers à entrer en sénescence, alors que ceux qui présentent une accumulation de NO plus tardive (plantes inoculées avec *nnrS2*) sénescent ultérieurement. Ce résultat conforte l'idée selon laquelle le NO pourrait être un signal d'induction de la sénescence des nodules. Cette proposition avait été émise par le groupe en 2012 et était basée sur le fait qu'une accumulation de NO dans les nodules conduit à une sénescence précoce des nodules et qu'inversement une réduction du niveau de NO retarde la mise en place de la sénescence (Cam *et al.*, 2012). De plus, il avait été montré qu'une application exogène de NO au niveau des nodules déclenche la sénescence des nodules de *M. truncatula*.

Par ailleurs, nous nous sommes demandé si la sénescence précoce des nodules formés par les différents mutants pouvait être induite suite à un défaut de libération des bactéries dans les cellules végétales et/ou un problème dans la différenciation des bactéries en bactéroïdes. Nous avons montré que dans les nodules induits par les différents mutants seul un défaut de viabilité des bactéroïdes est observé puisque ni la libération des bactéries dans les cellules végétales ni la différenciation des bactéries en bactéroïdes ne sont affectées. Il serait intéressant de savoir si la mort des bactéroïdes est due à la toxicité du NO ou est la conséquence indirecte de l'induction de la sénescence des nodules. La deuxième hypothèse semble plus pertinente puisque l'état « bactéroïde » est apparenté aux bactéries en phase stationnaire de croissance caractérisées par une plus grande résistance à de nombreux stress donc probablement aussi au NO. Par ailleurs, la concentration du NO dans les nodules est estimée de l'ordre du micromolaire (Meilhoc *et al.*, 2010); or les concentrations utilisées pour les tests de résistance au NO sont plus importantes et dans ces conditions nous observons un effet bactériostatique du NO plutôt que bactéricide. Cependant nous ne pouvons pas exclure la première hypothèse. Pour tester si la mort des bactéroïdes est due à la toxicité du NO, une idée d'expérience serait de travailler avec des bactéries qui sont plus résistantes au NO tout en gardant la même capacité de dégradation du NO. Par exemple, il faudrait tester si la surproduction de la protéine YtfE dans *S. meliloti* augmente la résistance des bactéries en culture. Si c'est le cas, en symbiose, nous pouvons supposer que les bactéroïdes soient aussi plus résistants au NO tout en gardant la même quantité de NO environnant. Ainsi, si la

surproduction d'YtfE en symbiose conduit à un retard dans l'apparition de la sénescence des nodules, alors nous pourrions conclure que le NO a un effet toxique sur les bactéroïdes.

La sénescence précoce des nodules induits par les différents mutants bactériens conduit à une diminution de la fixation d'azote et donc à une réduction du développement de la plante. A l'inverse, la surproduction de NnrS1 et Hmp améliore la fixation d'azote et augmente le rendement des plantes. Ces 2 protéines pourraient être des outils agronomiques très intéressants pour augmenter le rendement des plantes de la famille des légumineuses, et une méthode basée sur la surproduction d'Hmp a fait l'objet d'un brevet européen déposé par l'équipe (Bruand, Cam and Meilhoc, 2011). Néanmoins, cette stratégie de prolongation de la vie des nodules est soumise à controverse puisqu'il a été décrit qu'en conditions naturelles, la sénescence des nodules serait induite pour remobiliser le flux d'énergie et de carbone lors du remplissage des graines (Puppo *et al.*, 2005). Ainsi, allonger la vie des nodules serait surtout intéressant pour des légumineuses fourragères telles que la luzerne. Par ailleurs, en cas de stress tel que l'immersion des racines dans l'eau, la sénescence des nodules pourrait être une stratégie de la plante pour remobiliser l'énergie et survivre au stress (Sanchez *et al.*, 2011).

L'origine subcellulaire du NO dans l'induction de la sénescence est à ce jour méconnue. La visualisation du NO dans les nodules *nnrS2* en utilisant le biosenseur du NO a montré que 19 jours après inoculation, le NO est présent au niveau de quelques couches cellulaires de l'interzone. De façon intéressante, plus tard (26 jours), le NO est aussi détecté dans cette même zone dans les nodules WT. Cette observation suggère que l'origine du NO comme signal de l'induction de la sénescence se trouve au niveau de l'interzone du nodule. Ensuite, le NO se propagerait dans toute la zone de fixation. Ce résultat n'est pas en accord avec ceux publiés précédemment dans l'équipe qui suggèrent que c'est une augmentation locale de NO au niveau de quelques cellules de la zone de fixation qui est à l'origine de l'induction de la sénescence des nodules (Cam *et al.*, 2012). Cette divergence peut s'expliquer de 2 façons : tout d'abord les expériences n'ont pas été réalisées au même temps (19 et 26 jpi dans notre cas et 21 jours précédemment) et ensuite l'épaisseur des coupes de nodules est différente (60 µm dans notre cas et entre 80 et 100 µm précédemment). Pour discriminer entre ces hypothèses, il serait intéressant de faire une cinétique précise de détection de NO dans les nodules en se focalisant dans un premier temps sur les nodules formés par la souche WT. Ainsi, entre 10 et 30 jours post-inoculation, tous les 2 jours il serait intéressant de prélever les nodules et de visualiser le NO soit en utilisant le biosenseur du NO, soit la DAF-2DA.

Dans ce travail, nous montrons que les protéines NnrS1, NnrS2 et NorB jouent un rôle dans les phases tardives de la symbiose, au niveau des nodules matures. Le NO étant aussi détecté dans les phases précoces (microcolonie, cordon d'infection et primordia (del Giudice *et al.*, 2011) et l'expression des gènes codant pour ces 3 protéines étant induite par le NO, il est probable que NnrS1, NnrS2 et NorB jouent aussi un rôle dans l'établissement de la symbiose. Précédemment, il a été montré que des plantes inoculées avec une souche surexprimant Hmp (notée *hmp*⁺⁺) forment moins de nodules que les plantes inoculées avec une souche WT (del Giudice *et al.*, 2011). Par ailleurs, une souche *hmp*⁺⁺ est moins compétitive qu'une souche sauvage c'est-à-dire que lorsque les plantes sont inoculées avec un mélange 1 : 1 de souches WT et *hmp*⁺⁺, moins de 50% des nodules sont induits par la souche *hmp*⁺⁺ (del Giudice *et al.*, 2011). De façon intéressante, des résultats préliminaires suggèrent qu'une souche surexprimant *nnrS1* est aussi moins compétitive qu'une souche WT (données non montrées). Ainsi, il est possible que les protéines Hmp et NnrS1 soient impliquées dans le contrôle de l'infection.

Les résultats présentés dans cette thèse ont été produits à partir du couple symbiotique *M. truncatula*/ *S. meliloti*. La symbiose entre ces 2 partenaires conduit à la formation de nodules de type indéterminé caractérisés par un méristème persistant. On peut donc se demander si la régulation de la sénescence dans les nodules de type déterminé fait intervenir le NO et si la réponse bactérienne au NO est nécessaire pour le maintien de la symbiose. Dans ce type de nodules, la sénescence débiterait au centre du nodule et se propagerait vers la périphérie (Puppo 2005). Dans les nodules déterminés du lotier et du soja, du NO a été détecté (Maskall *et al.*, 1977 ; Meakin *et al.*, 2007). Une étude de 2009 a montré que la surexpression d'une hémoglobine non symbiotique de plante conduit à une diminution du niveau de NO dans les nodules du lotier et à une amélioration de la fixation de l'azote (Shimoda *et al.*, 2009). Il aurait été intéressant d'aller plus loin dans cette étude pour savoir si la surexpression de cette hémoglobine conduit à un retard dans la mise en place de la sénescence des nodules. Par ailleurs, il aurait été intéressant de tester si des nodules traités avec un donneur de NO entrent prématurément en sénescence. Chez *B. japonicum*, le symbionte du soja, l'expression des gènes codant pour la NO réductase est aussi dépendante de régulateurs répondant au NO. En revanche, à la différence des nodules de *M. truncatula*, les nodules de soja formés par un mutant *norC* contiennent la même quantité de NO que les nodules WT, suggérant que la NO réductase n'est pas la seule protéine impliquée dans le contrôle du niveau de NO dans ces nodules (Meakin *et al.*, 2007). Bien que son rôle dans la symbiose n'ait pas encore été décrit,

B. japonicum contient dans son génome un gène codant pour un homologue de Hmp de *S. meliloti* (35 % d'identité) (Sánchez *et al.*, 2011). Par ailleurs, *B. japonicum* et *M. loti* (symbiote du lotier) possèdent un homologue de la protéine NnrS mais à ce jour le rôle de cette protéine dans le déroulement de la symbiose n'a pas été testé. Il est possible que NnrS, comme dans les nodules indéterminés, participe au maintien de l'interaction symbiotique ou ait une autre fonction telle que la réparation des protéines endommagées par le NO décrite chez *Vibrio cholerae* (Stern *et al.*, 2013). Dans les symbioses fixatrices d'azote entre les plantes actinorhiziennes et les bactéries du genre *Frankia*, rien n'est connu à ce jour sur la régulation de la mise en place de la sénescence des nodules. Néanmoins, la présence de NO dans ce type de nodules a été suggérée. En effet, il a été montré qu'un traitement des nodules d'*Alnus firma* avec du NO exogène entraîne l'activation de la transcription de 2 gènes : un gène de *Frankia* codant pour une hémoglobine tronquée et un gène de la plante hôte qui code pour une hémoglobine non symbiotique suggérant que ces 2 protéines participent à la protection vis-à-vis du stress nitrosatif (Sasakura *et al.*, 2006 ; Niemann and Tisa, 2008).

III) Contribution respective de chacune des protéines dans le contrôle du niveau de NO dans les nodules

Nous avons montré que la mutation d'un seul gène bactérien codant pour une protéine impliquée dans le contrôle du niveau de NO dans les nodules conduit à une accumulation de NO et à un phénotype de sénescence précoce. Pour expliquer l'absence de redondance fonctionnelle, nous avons envisagé la possibilité que les protéines NnrS1, NnrS2, Hmp et NorB agissent en complexe. Pour tester cette hypothèse, des tests de complémentation fonctionnelle en culture ont été réalisés. Pour cela, nous avons analysé la sensibilité au NO des différentes souches portant un plasmide qui surexprime soit NnrS1, soit Hmp, et nous avons montré que la surexpression de *nnrS1* ou *hmp* dans un fond génétique mutant (*nnrS1*, *nnrS2*, *hmp*, *norB*) restaure la résistance au NO, suggérant que ces 4 protéines agissent indépendamment les unes des autres.

Par ailleurs, la bactérie n'est pas la seule à posséder des protéines qui contrôlent le niveau de NO dans les nodules. Du côté du partenaire végétal, les hémoglobines sont aussi capables de remplir cette fonction. Il existe 3 classes d'hémoglobines végétales : les hémoglobines symbiotiques ou leghémoglobines, les hémoglobines non symbiotiques et les hémoglobines tronquées. Les deux premières classes, en plus de leur fonction de transporteurs d'oxygène, ont la capacité de piéger et de dégrader le NO. Bien que ce rôle n'ait été décrit que

dans les nodules de soja et du lotier, nous pouvons supposer une fonction identique dans les nodules de *M. truncatula*. De façon intéressante l'expression de 12 gènes codant pour des leghémoglobines et 3 codant pour des hémoglobines non-symbiotiques sont exprimés dans les nodules de *M. truncatula* (Roux *et al.*, 2014).

Pour expliquer cette absence de redondance fonctionnelle des protéines bactériennes deux hypothèses sont envisagées. La première idée consiste à dire qu'il y a tellement de NO dans les nodules que tous les systèmes sont requis pour réguler cette quantité de NO. La deuxième hypothèse est que ces différentes protéines agissent à des moments différents au cours de l'interaction symbiotique. Cette dernière possibilité est à privilégier puisque l'accumulation de NO dans les nodules induits par les différents mutants bactériens est visible à des temps différents. En effet, à 14 jours post-inoculation seuls les nodules formés par *nnrS1* présentent une accumulation de NO par rapport aux nodules sauvages suggérant un rôle précoce de cette protéine. Plus tard, à 18 jpi, les nodules élicités par les mutants *hmp* et *norB* montrent une quantité de NO supérieure aux nodules WT et ce n'est qu'à 26 jours post-inoculation que les nodules induits par *nnrS2* présentent une quantité de NO supérieure aux nodules WT suggérant un rôle plus tardif de *NnrS2*. Par ailleurs, le projet Symbimics (Roux *et al.*, 2014), qui a notamment étudié le transcriptome de *S. meliloti* dans les différentes zones du nodule, nous a donné des indications quant aux profils d'expression des gènes *nnrS1*, *nnrS2*, *hmp*, *norB* et des gènes codant les hémoglobines de *M. truncatula*. *hmp* est surtout exprimé en interzone II/III et *nnrS1*, *nnrS2* et *norB* principalement en zone III. Quant aux hémoglobines, les gènes codant pour les hémoglobines non symbiotiques sont principalement exprimés au niveau des zones méristématique et d'infection et les gènes codant les leghémoglobines sont surtout exprimés au niveau de l'interzone et de la zone de fixation. Le niveau de transcription d'un gène ne reflétant pas forcément l'abondance de la protéine, il serait intéressant de faire des fusions traductionnelles de chacune des protéines bactériennes et hémoglobines végétales à une protéine rapporteur pour valider leur localisation subcellulaire. Par ailleurs, pour valider la première hypothèse selon laquelle la quantité de NO est très importante dans le nodule et que tous les systèmes sont requis pour réguler cette quantité de NO, un élément de réponse serait de regarder le phénotype de sénescence de mutants multiples. En effet, si les protéines bactériennes ont un effet additif, un double mutant devrait avoir un phénotype de sénescence plus précoce qu'un simple mutant, un triple mutant un phénotype plus prononcé qu'un double. Enfin, il est possible que d'autres systèmes de dégradation soient utilisés pour protéger *S. meliloti* du NO. En particulier, le génome de *S.*

meliloti contient 3 gènes codant pour des S-nitrosoglutathion réductases putatives susceptibles de participer à la détoxification du NO.

IV) Mode d'action du NO dans l'induction de la sénescence : étude de la tyrosine nitration de protéines végétales et bactériennes

Les mécanismes d'action du NO au cours de la symbiose et notamment dans l'induction de la sénescence des nodules sont inconnus et leur découverte demeure un réel challenge. Le NO agit notamment en induisant des modifications post-traductionnelles de protéines. Ces modifications NO-dépendantes sont divisées en 3 types : i) la S-nitrosylation, ii) la tyrosine nitration et iii) la métal-nitrosylation. Récemment, ces 3 types de modifications post-traductionnelles ont été identifiés dans les symbioses fixatrices d'azote. Cependant, une seule étude a caractérisé le rôle biologique de cette modification dans les nodules. Il s'agit d'une étude conduite en 2011 qui a montré que la glutamine synthétase (GS1a) végétale, une enzyme clé de l'assimilation de l'azote par les plantes, est tyrosine nitrée dans les nodules de *M. truncatula* (Melo *et al.*, 2011). Cette modification entraîne une inhibition de cette enzyme et serait nécessaire pour stimuler les réponses anti-oxydantes (Silva and Carvalho, 2013). En effet, le substrat de la GS1a, le glutamate, est aussi le précurseur de la synthèse du glutathion, un anti-oxydant.

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que la proportion de GS1a tyrosine nitrée est plus importante dans les nodules induits par les mutants *hmp* ou *nnrS1* par rapport aux nodules WT. Cette augmentation de la tyrosine nitration de la GS1a s'accompagne d'une diminution de l'activité de cette enzyme. Par ailleurs, nous montrons que la surexpression de *hmp* conduit à une diminution du taux de GS1a tyrosine nitrée qui est corrélée avec une augmentation de l'activité de cette enzyme. Par conséquent, les protéines bactériennes impliquées dans la dégradation du NO ne sont pas seulement dédiées à la protection de protéines bactériennes (par exemple la nitrogénase), mais jouent aussi un rôle majeur dans le contrôle de l'inhibition par le NO de protéines végétales. Cette conclusion soulève 2 points : le premier est la notion de compartimentation cellulaire. En effet, les protéines NnrS1 et Hmp sont prédites pour être localisées respectivement dans la membrane et le cytosol du bactéroïde et la GS1a est présente au niveau du cytoplasme de la cellule végétale. Ainsi le rôle de NnrS1 et Hmp n'est pas restreint au compartiment « bactéroïde ». Ceci peut s'expliquer par le fait que le NO est une molécule qui traverse facilement les membranes biologiques. Le deuxième point à soulever est le rôle des hémoglobines de plantes. En effet, bien que les hémoglobines

de plante soient localisées dans le même compartiment cellulaire que la GS1a, nous montrons ici qu'elles ne sont pas suffisantes pour protéger la GS de l'inhibition par NO. Les hémoglobines végétales et les protéines bactériennes impliquées dans la dégradation du NO peuvent avoir un rôle additif ou à l'inverse les protéines bactériennes pourraient être plus efficaces que les hémoglobines de plante. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la diminution d'expression des hémoglobines non-symbiotiques de *M. truncatula* sur la tyrosine nitration et l'activité de la GS1a. Une stratégie RNAi serait plus judicieuse étant donné qu'il existe 3 gènes codant pour les hémoglobines non symbiotiques et qu'il est possible qu'elles aient des fonctions redondantes.

Le cas de la glutamine synthétase comme protéine végétale protégée par des protéines bactériennes qui dégradent le NO n'est pas le seul. En effet, dans les nodules de soja (en symbiose avec *B. japonicum*), il a été montré que le taux de leghémoglobines métal-nitrosylées est plus important dans des nodules formés par le mutant *nor* que dans les nodules WT, particulièrement lors d'un stress de submersion (Sánchez *et al.*, 2010 ; Navascues *et al.*, 2011).

Une hypothèse serait que l'inhibition de la GS1a par tyrosine nitration est à l'origine de l'induction de la sénescence des nodules. En effet, il est souvent observé que des nodules formés par des mutants déficients dans la fixation ou l'assimilation de l'azote sénescent prématurément. De plus, l'étude du transcriptome de nodules de *M. truncatula* a révélé que l'inhibition de la GS par le phosphinothricine conduit à l'induction de la transcription de gènes impliqués dans la mise en place de la sénescence des nodules tels que les gènes codant pour les cystéines protéases (Seabra *et al.*, 2012). Cependant, les nodules issus de lignées transgéniques de *M. truncatula* sous-exprimant GS1a montrent une diminution de la fixation d'azote mais aucun signe de sénescence (H. Carvalho, communication personnelle) suggérant que l'inhibition de la GS1a n'est pas le principal facteur de l'induction de la sénescence des nodules. Nous pouvons émettre l'hypothèse que c'est l'inhibition par tyrosine nitration d'une ou plusieurs autre(s) protéine(s) bactérienne(s) et/ou végétale(s) qui est à l'origine de la mise en place de la sénescence. Ainsi, nous avons réalisé des profils de protéines tyrosine nitrées de nodules formés par différentes souches bactériennes. Dans les nodules accumulant du NO (nodules induits par les mutants *nnrS1*, *hmp* ou *norB*), les profils sont similaires et montrent des différences par rapport aux nodules WT. Curieusement, nous avons observé la disparition de plusieurs bandes. Ce résultat est en accord avec le fait que, dans les nodules mutants *nnrS1* et *hmp*, nous avons observé une diminution de la quantité de GS1a par rapport aux nodules

WT (données non montrées). En outre, une étude menée sur les nodules de soja a montré que le taux de leghémoglobine tyrosine nitrée diminue lors de la sénescence des nodules (Sainz *et al.*, 2015). Une hypothèse serait que dans certains cas, la tyrosine nitration constitue un signal d'adressage au protéasome. Une étude a montré que la tyrosine nitration en positions 46 et 48 du cytochrome c induit sa dégradation (Díaz-Moreno *et al.*, 2011).

Pour avoir plus facilement accès aux protéines bactériennes et ne pas être limité en quantité de matériel, nous avons simplifié le système en ne travaillant que sur des cultures bactériennes. Nous avons mis en évidence par Western blot anti-nitrotyrosine que suite à un traitement des cultures avec un donneur de NO, au moins 2 protéines, une proche de 38 kDa et l'autre d'environ 42 kDa sont tyrosine nitrées. Pour identifier ces protéines, nous avons découpé les zones autour de 38 et 42 kDa sur le gel SDS-PAGE et les protéines extraites ont été analysées en spectrométrie de masse. Nous avons établi une liste de 15 et 33 protéines potentiellement tyrosine-nitrées contenues respectivement dans la bande à 42 et 38 kDa. La plupart de ces protéines sont impliquées dans le métabolisme carboné et dans le transport des sucres. Parmi elles, se trouve la fructose biphosphate aldolase qui est une enzyme de la glycolyse. De façon intéressante, cette protéine a déjà été identifiée comme étant tyrosine nitrée lors de la mise en place des réactions de défense chez *A. thaliana*, cependant aucun effet biologique n'a été associé (Cecconi *et al.*, 2009). Une autre protéine, la glutathion synthétase, qui catalyse la synthèse du glutathion, est particulièrement intéressante. En effet, en présence de NO, nous pouvons envisager un mécanisme de protection des bactéries contre le NO qui consisterait à activer la glutathion synthétase par tyrosine nitration permettant ainsi la production de glutathion, un piègeur de NO. A ce jour, aucun exemple d'activation d'une protéine par tyrosine nitration n'a été démontré. Pour valider notre liste de protéines potentiellement tyrosine nitrées, il faudrait être en mesure de pouvoir détecter en spectrométrie de masse, le spectre correspondant à la nitration d'une tyrosine. A ce jour, nous n'y sommes pas parvenus. L'identification des protéines tyrosine-nitrées constitue un réel challenge dû principalement au fait que seule une faible proportion d'une protéine donnée est tyrosine nitrée (environ 1 %). Par conséquent, il est nécessaire d'avoir une technique d'enrichissement des protéines tyrosine-nitrées performante pour espérer augmenter le pourcentage des protéines tyrosine-nitrées par rapport à l'ensemble des protéines. Ainsi, nous poursuivons nos travaux et essayons de trouver de nouvelles techniques d'enrichissement de protéines tyrosine-nitrées notamment en séparant les protéines par des gels bidimensionnels.

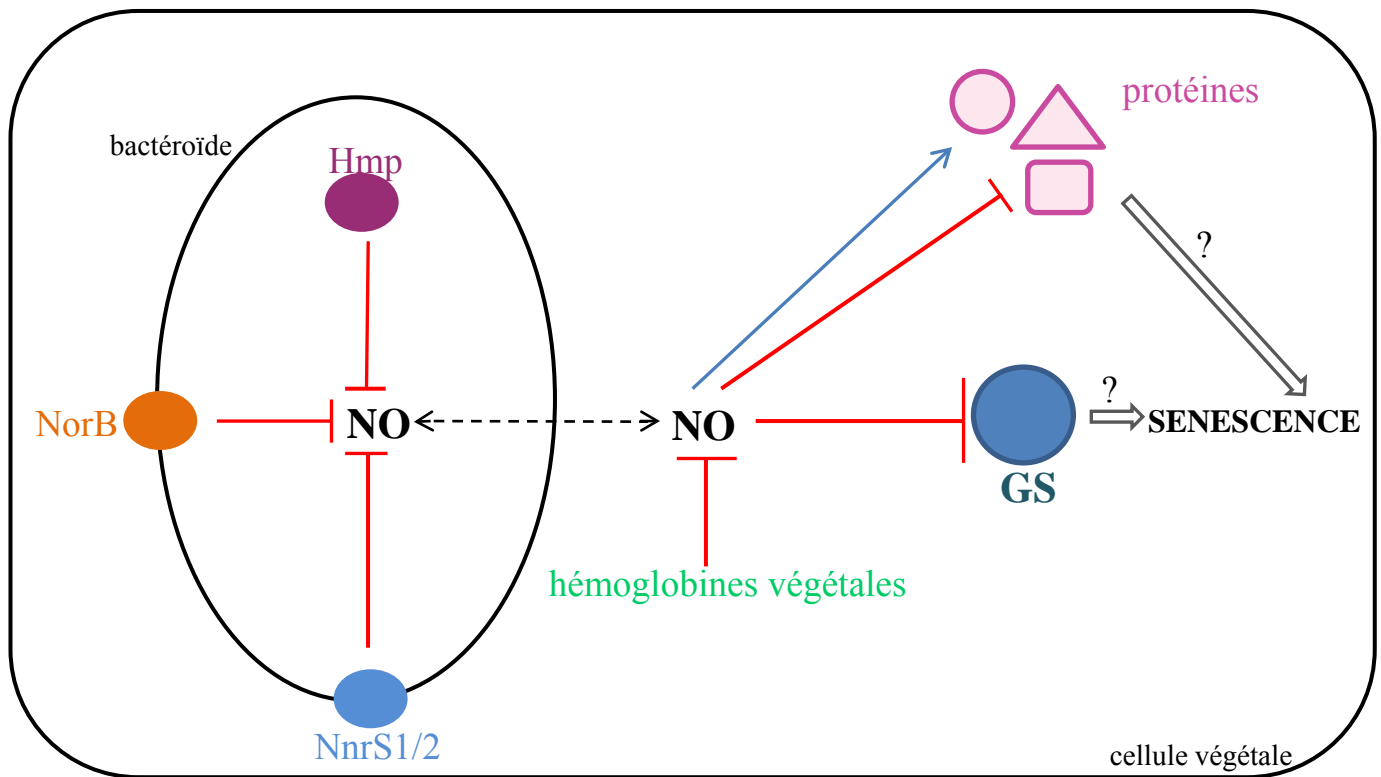


Figure 53: Contrôle du niveau de NO et sénescence des nodules: un modèle

La sénescence des nodules pourrait être déclenchée suite à la tyrosine nitration et inhibition de la GS mais aussi suite à la modification par le NO d'une ou plusieurs autre(s) protéine(s) végétale(s) ou bactérienne(s).

Au cours de cette thèse nous nous sommes focalisés sur l'étude de la tyrosine nitration de protéines dans le processus symbiotique et notamment lors de l'induction de la sénescence des nodules. Ce choix a été effectué sur 2 critères. Le premier est basé sur le fait que le seul exemple connu d'effet d'une modification post-traductionnelle dépendante du NO dans les nodules concerne la tyrosine nitration d'une protéine. Le deuxième point est lié au fait que la tyrosine nitration est une modification stable, ce qui en facilite son étude.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux de thèse nous a permis d'établir un modèle présenté en Figure 53. Les protéines bactériennes NnrS1, NnrS2, Hmp et NorB, en synergie avec les hémoglobines de plante, contrôlent le niveau de NO dans le cytosol de la cellule végétale empêchant ainsi l'inhibition de la GS par tyrosine nitration. Il serait vraiment intéressant par la suite de découvrir le mode d'action du NO dans l'induction de la sénescence des nodules. Des résultats préliminaires suggèrent que ce n'est probablement pas l'inhibition de la GS par tyrosine nitration qui est responsable du déclenchement de la sénescence des nodules. Cependant ce résultat nécessite d'être confirmé. Pour cela, il faudrait suivre la cinétique d'apparition des nodules sénescents de lignées RNAi de la GS. Il serait aussi intéressant de tester si la surexpression de la GS conduit à un retard dans l'apparition de la sénescence des nodules pour des plantes inoculées avec la souche WT ou les mutants *nnrS1*, *hmp* et *norB*. L'identification des autres protéines tyrosine nitrées dans les nodules reste un réel challenge dont l'étude mérite d'être poursuivie. En effet, en plus de nous permettre de peut-être découvrir le mode d'action du NO dans l'induction de la sénescence, cette étude permettrait de mieux comprendre les mécanismes d'action du NO qui sont à ce jour peu décrits chez les plantes. Par ailleurs, il serait intéressant d'étudier les 2 autres types de modifications post-traductionnelles induites par le NO, à savoir la S-nitrosylation et la métal-nitrosylation. En effet, des enzymes clés de la symbiose telles que la nitrogénase bactérienne ou la leghémoglobine végétale sont respectivement S-nitrosylée et métal-nitrosylée dans les nodules (Puppo *et al.*, 2013 ; Navascués *et al.*, 2012; Igamberdiev and Hill, 2004). Enfin, la caractérisation fonctionnelle des protéines NnrS est loin d'être terminée. Dans un premier temps il faudrait construire le mutant de surexpression de *nnrS2* et tester si cette protéine possède une activité NO réductase. Par ailleurs, NnrS1 et NnrS2 présentent plus d'homologie avec des oxydases respiratoires. Ainsi, il serait intéressant de tester si ces deux protéines sont aussi impliquées dans la respiration.

MATERIELS ET METHODES

I) Souches et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont listés dans le tableau 1.

1) Culture des souches bactériennes

Escherichia coli est cultivée dans le milieu LB (Luria-Bertani) : Tryptone 1%, extrait de levure 0.5%, NaCl 1% pH 7.

Les souches de *S. meliloti* sont cultivées dans du milieu LBMC (Milieu LB additionné de chlorure de calcium (2,5 mM) et de sulfate de magnésium (2,5 mM)).

Lorsque cela est nécessaire, des antibiotiques sont rajoutés dans le milieu aux concentrations suivantes: Carbenicilline (Cb) 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Kanamycine (Km) 50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Streptomycine (Sm) 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Néomycine (Neo) 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Gentamycine (Gm) 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Tetracycline (Tc) 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, Spectinomycine (Sp) 80 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

2) Construction du mutant de délétion *nnrS2*

Pour construire le mutant *nnrS2*, les régions flanquantes 5' et 3' UTR de *nnrS2* (326 et 317 pb respectivement) ont été amplifiées par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche Rm 2011 comme matrice et les oligonucléotides OCB 1104 (TGGATCCGAGCACCGAGGAT) /OCB 1105 (TCGCGAGCTCGCGCGATAAA) et OCB 1106 (ACAGTCGACGAGCCACATGA) /OCB 1107 (AGGATCCCTGCTAAGTCGTG) comme amorces, respectivement. Les produits PCR ont été ensuite ligués avec le vecteur pGEM-T donnant les plasmides pGEM 5'UTR et pGEM 3'UTR respectivement (Tableau 1). Les régions clonées ont été vérifiées par séquençage de l'ADN. Les plasmides ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction SalI/BamHI ou BamHI/SacI pour extraire les régions 3'et 5'UTR respectivement. Les UTRs ont ensuite été ligués avec le vecteur pJQ200mp19 (Tableau 1) préalablement digéré avec SalI et SacI donnant le plasmide pJQ200mp19 5' 3'UTR *nnrS2* (Tableau 1). Après transfert dans la souche *E. coli* DH5 α électrocompétente, le plasmide a été extrait puis vérifié par séquençage en utilisant les amorces M13 -20 (GTAAAACGACGGCCAGT) et M13 Rev(GGAAACAGCTATGACCAT).

Ce plasmide a été introduit dans la souche *S. meliloti* Rm 2011 par conjugaison triparentale en utilisant le plasmide « Helper » pRK2013. L'intégration génomique par simple crossing-

over du plasmide pJQ200mp19 5' 3'UTR *nnrS2* a été sélectionnée en présence de Gentamycine. Un clone isolé a été ensuite cultivé en milieu LBMC liquide dépourvu d'antibiotique. Le plasmide porte le gène *sacB* qui est létal pour *S. meliloti* en présence de sucrose. Les bactéries ayant perdu le plasmide par un deuxième évènement de recombinaison ont par conséquent été sélectionnées sur boîte LBMC en présence de sucrose (5%). Un clone sensible à la gentamycine a ensuite été sélectionné et la délétion du gène *nnrS2* a été vérifiée par PCR en utilisant les amorces OCB905 (GATTTCTGAACCCGGACAA)/ OCB1467 (CAACACCGTCGCAGC). La souche obtenue a été nommée CBT 1418.

3) Construction des souches surexprimant *nnrS1* et *hmp*

Pour construire les souches surexprimant *nnrS1*, nous avons introduit dans le plasmide réplcatif pBBRMCS-5, le gène codant pour NnrS1 en aval du promoteur *lac*. Le gène *nnrS1* a d'abord été cloné dans le plasmide pGEM-T (pGEM-T *nnrS1*). La région clonée a été vérifiée par séquençage. Les plasmides pBBRMCS-5 et pGEM-T *nnrS1* ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction PstI et SacI et le fragment correspondant au gène *nnrS1* a été ligué avec le plasmide linéarisé pBBRMCS-5 pour donner le plasmide pBBR-*nnrS1*. Après transfert dans la souche *E. coli* DH5α électrocompétente, le plasmide a été extrait puis vérifié par séquençage en utilisant les amorces M13 -20 et M13 Rev.

Ce plasmide a été introduit dans *S. meliloti* Rm 2011 (WT), *nnrS1* (CBT 619), *nnrS2* (CBT 1418), *hmp* (CBT 613) et *norB* (CBT 618) par conjugaison triparentale.

Pour construire les souches surexprimant *hmp*, le plasmide pBBR-*hmp* construit par Meilhoc *et al*, en 2010 a été introduit par conjugaison triparentale dans les souches *S. meliloti nnrS1* (CBT 619), *nnrS2* (CBT 1418), *hmp* (CBT 613) et *norB* (CBT 618).

4) Construction des souches contenant le biosenseur du NO

Le biosenseur du NO consiste en un plasmide rapporteur (pSMa1289-*lacZ*) contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène *SMa1289* de *S. meliloti* spécifiquement induit par le NO et *lacZ*. Ce plasmide a été construit précédemment dans l'équipe (del Guidice *et al*, 2012). Par conjugaison triparentale, le plasmide a été introduit dans les souches Rm2011(WT), CBT 619 (*nnrS1*), CBT 1418 (*nnrS2*), CBT 613 (*hmp*), CBT 618 (*norB*), CBT 1514 (WT pBBR *nnrS1*), CBT 1477 (*norB* pBBR *nnrS1*) et CBT 1639 (*nnrS1* pBBR *nnrS1*).

Tableau 1 : souches et plasmides utilisés

| Souche ou plasmide | Description | Référence ou source |
|-------------------------------|---|----------------------------------|
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> | | |
| Rm2011 | WT, Sm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT613 | Rm2011 <i>hmp</i> ::Tn5, Sm ^r , Nm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT618 | Rm2011 <i>norB</i> ::Tn5, Sm ^r , Nm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT619 | Rm2011 <i>nnrS1</i> ::Tn5, Sm ^r , Nm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT1418 | Rm2011 Δ <i>nnrS2</i> , Sm ^r | Ce travail |
| CBT602 | Rm2011 contenant pBBR- <i>hmp</i> , Sm ^r , Gm ^r | (Meilhoc <i>et al.</i> , 2010) |
| CBT 1477 | CBT 618 contenant pBBR- <i>nnrS1</i> , Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT 1514 | Rm2011 contenant pBBR- <i>nnrS1</i> , Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT 1516 | CBT 619 contenant pBBR- <i>nnrS1</i> , Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT1518 | CBT 1418 contenant pBBR- <i>nnrS1</i> , Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT 1520 | CBT 613 contenant pBBR- <i>nnrS1</i> , Sm ^r , Gm ^r | (Meilhoc <i>et al.</i> , 2010) |
| CBT 1546 | CBT 618 contenant pBBR- <i>nnrS1</i> , Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |

| | | |
|----------|--|----------------------------------|
| CBT 1637 | CBT 613 contenant pBBR-nnrS1, Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT 1638 | CBT 1418 contenant pBBR-nnrS1, Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT 1639 | CBT 619 contenant pBBR-nnrS1, Sm ^r , Gm ^r | Ce travail |
| CBT 979 | Rm2011 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Tet ^r | Del Giudice <i>et al.</i> , 2011 |
| CBT 1043 | CBT 613 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Nm ^r , Tet ^r | Cam <i>et al.</i> , 2012 |
| CBT 1055 | CBT 602 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Gm ^r , Tet ^r | Cam <i>et al.</i> , 2012 |
| CBT 1368 | CBT 619 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Nm ^r , Tet ^r | Ce travail |
| CBT 1374 | CBT 618 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Nm ^r , Tet ^r | Ce travail |
| CBT 1489 | CBT 1418 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Tet ^r | Ce travail |
| CBT 1552 | CBT 1514 contenant pCZ962 p <i>SMa1289-lacZ</i> Sm ^r , Gm ^r , Tet ^r | Ce travail |

Escherichia coli

| | | |
|------|--|------------|
| DH5α | <i>supE44 Δ lacU169 (Φ 80 lacZΔm15) hsdR17 recA1 endA gyrA96 thi-1 relA1 λ⁻</i> | Invitrogen |
|------|--|------------|

Plasmides

| | | | |
|----------------------------|---------|---|------------------------------------|
| pGEM-T | | Vecteur de clonage, Amp ^r | Promega |
| pGEM 3'UTR | | 3'UTR <i>nnrS2</i> ligué avec pGEM-T, Amp ^r | Ce travail |
| pGEM 5'UTR | | 5'UTR <i>nnrS2</i> ligué avec pGEM-T, Amp ^r | Ce travail |
| pGEM <i>nnrS1</i> | | <i>nnrS1</i> ligué avec pGEM-T, Amp ^r | Ce travail |
| pBBR- <i>nnrS1</i> | | pBBRMCS-5 + <i>nnrS1</i> , Gm ^r | Ce travail |
| pBBR- <i>hmp</i> | | pBBRMCS-5 + <i>hmp</i> , Gm ^r | (Meilhoc <i>et al.</i> , 2010) |
| pJQ200mp19 | | Vecteur de remplacement de gène, Gm ^r | (Sauviac <i>et al.</i> , 2007) |
| pJQ200mp19 <i>nnrS2</i> | 3'5'UTR | 3' 5'UTRs <i>nnrS2</i> ligué avec pJQ200mp19, Gm ^r | Ce travail |
| p <i>Sma1289-lacZ</i> | | Plasmide pCZ962 portant le gène <i>lacZ</i> sous le contrôle du promoteur du gène <i>Sma1289</i> , Tet ^r | (del Giudice <i>et al.</i> , 2011) |
| pRK2013 | | Plasmide "Helper" pour la conjugaison triparentale, Km ^r | (Figurski and Helinski, 1979) |

II) Test de sensibilité au NO

Les souches de *S. meliloti* sont cultivées à 28°C sous agitation dans du milieu de Vincent : K₂HPO₄ 5.74 mM, KH₂PO₄ 7.35 mM, MgSO₄ 1 mM, NH₄Cl 18.7 mM, Na₂ succinate 10 mM, CaCl₂ 456 µM, FeCl₃ 35 µM, biotine 4 µM, H₃BO₃ 48.5 µM, MnSO₄ 10 µM, ZnSO₄ 1 µM, CuSO₄ 0.5 µM, CoCl₂ 0.27µM et NaMoO₄ 0.5 µM .

Le donneur de NO, Spermine NONOate (SpNN) (Cayman Chemicals Coger (CAY-82150-M100) préparé extemporanément dans une solution de NaOH (0,01 M) est ajouté dans les cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance (DO= 0.2) aux concentrations souhaitées. Les cultures sont ensuite réparties dans une microplaque de 96 puits à raison de

200 µl/ puits et la croissance bactérienne est mesurée toute les 10 minutes pendant 20 heures avec un lecteur de plaque (Fluostar Omega, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). Pour chaque condition, la courbe de croissance est tracée et le temps d'arrêt de croissance mesuré. Les moyennes significativement différentes ont été détectées par un test ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple de moyennes appelé test de Tukey.

IV) Conditions de croissance des plantes

Les graines de *M. truncatula* Jemalong A17 sont traitées avec de l'acide sulfurique 97 % pendant une douzaine de minutes. Dès l'apparition de points noirs sur les graines, elles sont rincées dans trois bains successifs d'eau stérile. Les graines sont ensuite incubées dans 25 ml d'eau de javel pendant 2 minutes. Après 3 lavages successifs à l'eau stérile, les graines sont déposées sur un milieu gélosé 1X et placées à 4°C pendant 24h, puis à 20 °C pendant 20h, avant d'être déposées dans des tubes contenant du milieu Farhaeus sans azote en gélose inclinée (Vincent, 1970). Après 48h d'incubation en chambre de culture à 22°C avec 16h de jour et 8h de nuit, les plantules sont inoculées avec 200 µl d'une suspension de bactéries à DO= 0.001 (dans de l'eau stérile).

Pour les expériences de tyrosine nitration de la GS, les plantules de *M. truncatula* Jemalong J5 sont cultivées en conditions d'aéroponie avec 16 h de lumière (22°C) /8 h d'obscurité (19°C) et une intensité lumineuse de 150-200 µmol m⁻² s⁻¹, dans un milieu contenant du nitrate d'ammonium comme décrit précédemment (Lullien *et al.*, 1987). Pour induire la nodulation, le milieu est remplacé par du milieu dépourvu de source d'azote 3 jours avant inoculation avec soit la souche *S. meliloti* Rm2011, soit les mutants *hmp* (CBT613), *nnrS1* (CBT619), *nnrS2* (CBT1418) ou *hmp*⁺⁺ (CBT602). Les nodules sont ensuite collectés à 21 jours post-inoculation.

IV) Détection et quantification du NO

1) Détection sur coupes de nodules

Utilisation d'une sonde fluorescente spécifique du NO, la DAF-2-DA

Les nodules récoltés 19 jours post-inoculation sont coupés à l'aide d'un vibratome Leica VT1200S. Les coupes (60 µm) sont incubées sous agitation pendant 30 min à l'obscurité dans 1 ml de tampon Tris-KCl (Tris 10 mM pH 7,4, KCl 10 mM) contenant 1 µM de DAF-2DA

(Kojima *et al.*, 1998). Les coupes sont ensuite observées entre lame et lamelle à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 SE avec le logiciel Leica confocal software). La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm et la détection se fait à 530 nm. Pour s'assurer que la fluorescence obtenue est spécifique du NO, certaines coupes sont traitées pendant 20 min avec un piègeur de NO, le cPTIO (10 μ M). La valeur de fluorescence ainsi obtenue sera considérée comme la valeur du bruit de fond.

Utilisation de souches biosenseurs du NO

Le biosenseur du NO consiste en un plasmide rapporteur (pSMa1289-lacZ) contenant une fusion transcriptionnelle entre le promoteur du gène SMa1289 de *S. meliloti* et lacZ. Des plantules de *M. truncatula* ont été inoculées avec différentes souches de *S. meliloti* contenant le biosenseur. Trois semaines après-inoculation, les coupes de nodules (60 μ m) obtenues avec un vibratome Leica VT1200S ont été fixées dans du tampon Z' (Tampon phosphate 0.1 M pH 7.4; KCl 10 mM; MgSO₄ 1 mM) contenant du glutaraldehyde (1.25 %) sous cloche pendant 1.5 h. Les coupes sont rincées 3 fois 10 minutes dans le tampon Z' avant d'être incubées dans 1 ml de tampon de coloration (Tampon Z' ; Ferricyanure de potassium 5 mM ; Ferrocyanure de potassium 5 mM ; X-gal 0,8 %). Les coupes sont ensuite incubées sous vide pendant 1 h à température ambiante, puis pendant au moins 1 h à 37°C. Les coupes disposées entre lame et lamelle sont observées au microscope photonique en champ clair (Axioplan imagin2 from Zeiss).

2) Quantification du NO

Dans les nodules : Dosage du NO avec la DAF-2

Le NO libéré des nodules par diffusion est quantifié en utilisant une sonde fluorescente spécifique du NO non perméante, la DAF-2 (Sigma Aldrich) comme décrit précédemment (Horchani *et al.*, 2011). Dix plantes sont inoculées avec chaque génotype bactérien et leurs nodules sont récoltés à 14, 18 et 26 jours post-inoculation (jpi) et groupés dans une plaque multi puits contenant 1 ml de Tris KCl 10 mM pH 7.5 avec DAF-2 (10 μ M). La fluorescence est mesurée toutes les 5 minutes pendant 3 h à l'aide d'un lecteur de plaque (Fluostar Omega, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) à 28°C (longueur d'onde d'excitation, 495 nm/ longueur d'onde d'émission, 515 nm). A la fin de la mesure, les nodules sont récupérés, séchés et pesés. La pente de la courbe est calculée et exprimée en unité de fluorescence par min par mg de nodules. Pour déterminer la fluorescence non spécifique du NO, un piègeur de NO, le cPTIO (Sigma Aldrich) (10 μ M) est ajouté dans un puits contenant

des nodules WT, 20 min avant l'addition de la sonde DAF-2. Il faut noter que l'utilisation du cPTIO en présence de DAF2 peut induire un biais. En effet, le cPTIO semble accentuer la fluorescence de la DAF2 en absence de NO. Les analyses statistiques (test ANOVA et test de Tukey) ont été réalisées avec le logiciel R.

En culture

*** Mesure indirecte de la quantité de NO en dosant l'activité β -galactosidase**

Les souches contenant le biosenseur sont cultivées en phase exponentielle de croissance en milieu minimum de Vincent (Cf test de sensibilité au NO) (DO= 0.2) à 28°C. 10 μ M de donneur de NO (SpNN) sont ajoutés dans les différentes cultures. Après 1 h d'incubation, la DO₆₀₀ est mesurée et 100 μ l de la culture sont utilisés pour doser l'activité β -galactosidase selon la méthode de Miller (Miller, 1972). Les analyses statistiques (test ANOVA et test de Tukey) ont été réalisées avec le logiciel R.

*** Mesure directe de la quantité de NO avec un analyseur de NO**

Les différentes cultures bactériennes cultivées en milieu minimum de Vincent (200 ml ; DO₆₀₀= 0.25) dans des erlenmeyers de 3 l sont placées pendant 30 min en condition de microaérobie (2 % d'oxygène). A l'aide d'une seringue, 20 mM de KNO₃ sont ajoutés dans les cultures et après 1 h d'incubation la quantité de NO gazeux est mesurée en utilisant un analyseur de NO (Analyseur par chemiluminescence, modèle 17i, Megatec). Les résultats sont exprimés en ppb (1 ppb = 1 molécule de NO détectée parmi 1 milliard d'autres molécules). Les analyses statistiques (test ANOVA et test de Tukey) ont été réalisées avec le logiciel R.

V) Extraction d'ARN de nodules, reverse transcription et analyse d'expression du gène *hmp*

23 jours post-inoculation, une quinzaine de nodules de chaque génotype sont congelés dans l'azote liquide et broyés avec un mortier. Le lysat est resuspendu avec 1 ml de tampon NAES (sodium acétate 50 mM, EDTA 10 mM, SDS 1%) préparé extemporanément et préchauffé à 60 °C. Après ajout d'1 ml de phénol acide préchauffé à 60°C, les échantillons sont incubés 5 min à 60 °C puis 5 min à 4 °C. Après centrifugation ((Vitesse maximum (Vmax), 15 min, 4°C)), le surnageant est récupéré et 1 ml de phénol acide froid est ajouté. L'échantillon est centrifugé (Vmax, 10 min, 4 °C) et le surnageant est resuspendu avec 1 ml de chloroforme.

Après centrifugation (Vmax, 5 min, 4°C), le surnageant est récupéré et 1 ml d'isopropanol froid est ajouté. Les échantillons sont incubés pendant 1 h à 4 °C puis centrifugés (Vmax, 30 min, 4 °C). Le culot est lavé dans 1 ml d'éthanol 70 % froid. Après centrifugation (Vmax, 30 min, 4 °C), le surnageant est jeté et les culots sont séchés à l'air libre. Les culots sont resuspendus avec 33 µl d'eau ultra pure. L'intégrité des ARNs est vérifiée sur un gel d'agarose et leur quantité est dosée avec un nanodrop à 260 nm. Les ARNs sont ensuite traités à la DNaseI ((protocole Qiagen (Qiagen, Hilden, Germany)). 1 µg d'ARN est utilisé comme matrice pour la réaction de reverse transcription. La reverse transcription a été réalisée en utilisant la reverse transcriptase Superscript II (Invitrogen) et des hexamères aléatoires comme amorces. La PCR quantitative a été effectuée avec le Light Cycler FastStart Reaction Mix MasterPLUS SYBR Green I (Roche) en suivant les instructions du fournisseur et les amorces complémentaires du gène *hmp* ((OCB905(GATTTCTGAACCCGGACAA) et OCB906 (CAGCAAGGACGAGACATA)). Pour normaliser les résultats, les ARNr 16S ont été utilisés comme référence ((OCB 786 (CGGCAGACGGGTGAGTAAC)/ OCB 788 (CTCATACGGTATTAGCACAAGTTTCC)).

VI) Dosage du N₂O par chromatographie en phase gazeuse

Les différentes souches bactériennes cultivées en milieu minimum de Vincent (DO₆₀₀= 0.25) sont placées pendant 30 min en condition de microaérobie (2 % d'oxygène). A l'aide d'une seringue, 5 µM de SpNN sont ajoutés dans les cultures et après 1 h d'incubation, 20 ml d'air sont prélevés à l'aide d'une seringue et transférés dans des fioles en verre de 10 ml contenant 6 M d'une solution de NaCl et fermées hermétiquement. L'analyse de la concentration en N₂O est réalisée par un chromatographe en phase gazeuse (SRI® 8610C gas chromatograph, Torrance, CA, USA) équipé d'un détecteur à capture d'électron (ECD). 500 µl de gaz de chaque échantillon est manuellement injecté dans le chromatographe à l'aide d'une seringue de précision. Pour calibrer, tous les 10 échantillons injectés, du N₂O commercial de haute précision est injecté (988 ± 49 ppbv, Air Liquide). Les échantillons sont injectés en duplicat et ont une variabilité inférieure à 5 %. Les analyses statistiques (test ANOVA et test de Tukey) ont été réalisées avec le logiciel R.

VII) Dosage d'une activité NO réductase

Les souches de *S. meliloti*, cultivées à 28°C sous agitation dans du milieu de Vincent ($DO_{600}=0.2$) sont placées pendant 2 h en condition de microaérobie (2 % d'oxygène). Les cultures sont ensuite diluées de façon à avoir une $DO_{600}=0.0008$. L'activité NO réductase est mesurée selon le protocole décrit par Sanchez *et al.*, 2010 avec quelques modifications : le tampon phosphate 10 mM utilisé a un pH de 7.8 au lieu de 7,5 ; la solution de dithionite de sodium est aérobie et le donneur de NO est le DEA NONOate Sodium Salt (50 μ M, Sigma).

VIII) Observation et mesure des paramètres biologiques liés à la sénescence des nodules

1) Suivi de la sénescence des nodules

Des séries de 10 plantes sont inoculées avec chaque génotype bactérien. Tous les 2 jours à partir de 5 jpi, les nodules sont observés avec une loupe binoculaire. Un nodule est considéré comme sénescant lorsque qu'une zone verte apparaît à la base du nodule. Pour chaque série, les nombres de nodules sénescants et totaux sont comptés et le pourcentage de nodules sénescants est déterminé. L'expérience est répétée 3 fois et la moyenne des pourcentages des nodules sénescants est calculée sur l'ensemble d'une série de plantes. Les analyses statistiques (test ANOVA et test de Tukey) ont été réalisées avec le logiciel R.

2) Microscopie électronique et coloration au bleu de Toluidine

Trois semaines après-inoculation, les nodules sont récoltés et fixés dans du tampon phosphate (KPi) 0.1 M, pH 7.5 contenant du formaldéhyde 2.5 %, du glutaraldéhyde 1.5 % et du triton X-100 (0.01 %) pendant 45 min sous vide puis laissés toute la nuit à température ambiante. Les nodules sont ensuite lavés 5 fois pendant 20 min dans le tampon KPi puis 5 fois dans de l'eau ultrapure. Le dernier lavage est laissé sur la nuit. Les nodules sont ensuite fixés dans une solution d'osmium OsO_4 1 % (dans de l'eau) pendant 2 h. Les nodules sont ensuite soigneusement lavés dans de l'eau ultrapure pendant plusieurs jours puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol (30, 50, 70, 95, 100 %) puis d'acétone (100 %) avant imprégnation dans la résine Spur (Electron Microscopy Science). Après 8 h de polymérisation, les nodules sont coupés (2 μ m) (Ultracut, Reichert-Jung) et les coupes sont colorées avec une solution comprenant du bleu de toluidine 0.1 % et du bleu de méthylène 0.2 %. Après disposition entre

lame et lamelle, les coupes sont observées au microscope photonique en champ clair (Axioplan imagin2 from Zeiss).

Pour l'analyse en microscopie électronique, les nodules sont coupés (70-80 nm) (Ultracut, Reichert-Jung) et les coupes sont disposées sur une grille de cuivre puis colorées avec de l'acétate d'uranyl 0.5 % (dans 50 % Ethanol). Les Observations sont faites avec un microscope électronique à transmission (Hitachi HT7700).

3) Coloration avec la sonde « Live and Dead »

Les nodules obtenus 3 semaines post-inoculation sont récoltés puis imprégnés dans 5 % d'agarose avant d'être coupés avec un vibratome (Leica VT1200S). Les coupes de nodules obtenues (60 μ M) sont incubées pendant 20 min dans une solution de coloration « Live and Dead » ((SYTO9 5.01 μ M, iodure de propidium 29.9 μ M dans du tampon Tris 50 mM, pH 7.0 (Live/Dead®BacLight™, Invitrogen)). Après 3 lavages dans de l'eau osmosée, les coupes de nodules sont montées entre lame et lamelle et observées au microscope confocal.

4) Fixation de l'azote mesurée par le test de réduction de l'acétylène (ARA)

Le test de réduction de l'acétylène (ARA) mesure l'activité de la nitrogénase bactérienne. En effet, cette enzyme est capable de réduire l'acétylène en éthylène ; la formation de l'éthylène est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Les tubes contenant les plantes cultivées sur du milieu Farhaeus sont hermétiquement fermés avec des bouchons en caoutchouc. 6 ml d'air sont retirés du tube en utilisant une seringue et remplacés par 6 ml d'acétylène gazeux. Les plantes sont laissées à température ambiante pendant 2 à 3h puis 0,2 ml de gaz sont prélevés à l'aide d'une seringue et injectés dans un chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard 5890 serie II). La hauteur du pic d'éthylène est ensuite mesurée sur le chromatogramme. Le rapport entre la hauteur du pic d'éthylène et le temps d'incubation avec l'acétylène est calculé et les moyennes sont calculées à partir des valeurs obtenues pour 8 plantes par génotype. Les analyses statistiques (test ANOVA et test de Tukey) ont été réalisées avec le logiciel R.

5) Mesure du poids sec des parties aériennes des plantes

Les parties aériennes des plantes sont coupées au niveau du collet et insérées dans des tubes en verre. A l'aide d'une balance de précision, le poids secs des parties aériennes d'environ 30 plantes par génotype est déterminé après incubation à 65°C pendant 72 h. La moyenne est réalisée à partir des valeurs obtenues et les analyses statistiques (test de Student) ont été réalisées avec le logiciel Microsoft Excel.

IX) Quantification de la tyrosine nitration et activité de la Glutamine Synthétase (GS)

Ces expériences ont été réalisées par le groupe d'Helena Carvalho (IBMC, Porto).

1) Extractions des protéines, SDS-PAGE et analyse par Western blot

Les nodules de *M. truncatula* sont broyés dans un mortier à 4°C dans 2 volumes de tampon d'extraction ((PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM), pH 7.4 contenant Triton X-100 0.05 % et PMSF 1 mM)). Le broyat est centrifugé à 13000 g pendant 20 min à 4°C et le surnageant est récupéré. La concentration en protéines totales est mesurée avec le test Bradford (BioRad) en utilisant la BSA comme standard. Les protéines sont séparées sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Criterion Blotter, BioRad). L'immunodétection de la GS est réalisée en utilisant un anticorps de lapin dirigé contre une isoforme de la GS de *Phaseolus vulgaris* (fourni par Dr. Julie Cullimore de l'INRA de Toulouse) et un anticorps secondaire de lapin conjugué à une peroxydase (Vector Laboratories). L'immuno complexe est détecté par chemiluminescence en utilisant le système de détection ECLTM (GE Healthcare, Lifesciences) et un film photographique. Un western blot représentatif d'au moins 3 expériences indépendantes est présenté. La quantification de la GS est réalisée en utilisant un densitomètre (Molecular imager GS800, BioRad) et le logiciel Quantity 1-D analysis (BioRad).

2) Quantification de la nitration de la GS par un test ELISA

Une plaque microtitration (F8 Maxisorp Nunc-Immuno module, Nunc, Roskilde, Danemark) est incubée avec un anticorps anti-glnA dilué dans du tampon PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM) (50 µL/puits) toute la nuit à 4°C (Cullimore *et al.*, 1984). Après 2 lavages (PBS, pH 7.4, Tween 20 0.5 %), la plaque est saturée (PBS, pH 7.4, BSA 3%, 100 µL/puits) pendant 2 h à température ambiante. Le tampon de saturation est enlevé et les extraits végétaux sont dilués dans du tampon d'extraction (10 µg dans 50 µL) puis déposés sur la plaque (50 µL/puits) et incubés pendant 4 h à température ambiante. Toutes les expériences ont été réalisées en double. Après 5 lavages, un anticorps monoclonal dilué, marqué à la biotine et dirigé contre les 3-nitrotyrosines (100 µL/puits, Cayman Chemical) est ajouté sur la plaque et incubé 2 h à température ambiante. Après lavage, un anticorps conjugué à la NeutrAvidine et à une peroxydase (Invitrogen) est ajouté dans chaque puits et incubé 1 h à température ambiante. Après 4 lavages, la plaque est incubée avec le substrat *p*-nitrophenyl phosphate substrate (100 µL/puits) (Sigma FastTM, Sigma-Aldrich Inc.,

St.Louis, Mo., U.S.A.) pendant 30 min à température ambiante. La réaction est arrêtée par l'addition de 100 µL/puits de H₂SO₄ (0.25 M) et l'absorbance est mesurée à 405 nm en utilisant un lecteur de plaque (µQuant Microplat Spec, Biotek). Une courbe étalon a été établie en faisant une dilution en série (1 à 5 ng) de la GS nitrée *in vitro*. Pour cela, la MtGS1a produite chez *E. coli*, a été purifiée et pré-incubée avec 100 µM de peroxyxynitrite pendant 15 min à température ambiante. Etant donné qu'il est impossible d'assurer que la totalité des molécules de GS sont tyrosine nitrées lors de l'incubation *in vitro* de la GS avec du peroxyxynitrite, les valeurs de nitration de la GS sont des valeurs arbitraires exprimées en fonction des quantités relatives de GS cytosolique quantifiées par densitométrie. Un test statistique de Student a été réalisé.

3) Détermination de l'activité de la GS

L'activité de la GS est déterminée en utilisant le test d'activité transférase (Cullimore and Sims, 1980). Une unité d'activité transférase équivaut à 1 µmole de γ-glutamyl hydroxamate produit par min à 30°C. Les données d'activité correspondent à la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes, avec pour chaque expérience 3 réplicats techniques.

X) Tyrosine nitration de protéines bactériennes

1) Profil de protéines tyrosine nitrées de nodules

Les nodules sont récoltés 20 jpi. Les protéines sont extraites selon le protocole décrit dans Melo *et al.*, (2011) et 15 µg sont déposés sur un gel précoulé SDS-PAGE à gradient 4-12 % (Nupage 4-12% Bis-Tris gel, Invitrogen) en suivant les recommandations du kit. Après transfert sur membrane PVDF (fluorure de polyvinylidène), l'immunodétection des protéines tyrosine nitrées est réalisée en utilisant un anticorps monoclonal anti nitrotyrosine (Cayman Chemical) 2 µg/ml et un anticorps secondaire de souris conjugué à une peroxydase dilué 10000X (Cayman Chemical). L'immuno complexe est détecté par chimoluminescence en utilisant le système de détection ECLTM (GE Healthcare, Lifesciences)

2) Profil de protéines tyrosine nitrées de cultures bactériennes

* Extraction des protéines, SDS-PAGE et analyse par Western blot

Les cultures bactériennes sont cultivées en milieu minimum de Vincent à 28°C (Cf test de sensibilité NO) soit en phase exponentielle de croissance (DO₆₀₀= 0.2) soit en phase stationnaire de croissance (DO₆₀₀= 0.9 pendant 8 h) et en condition d'aérobie ou de

microaérobie (2 % d'oxygène pendant 1 h 30). Ces cultures sont traitées de 2 façons différentes : dans un premier cas les cultures sont traitées avec un donneur de NO et dans un deuxième cas ce sont les protéines extraites des cultures qui sont traitées avec un donneur de NO :

-Traitement des cultures avec un donneur de NO : les cultures bactériennes sont traitées pendant 60 minutes avec un donneur de NO, la SpermineNONOate (SpNN, Cayman Chemical) à différentes concentrations à 28°C sous agitation (sans agitation pour la condition microaérobie). La condition contrôle consiste à ajouter du dithionite de sodium (20 mM, Sigma), un agent réducteur des tyrosines nitrées pendant 30 min à température ambiante sous agitation lente. Les cultures (20 ml en phase exponentielle et 8 ml en phase stationnaire) sont centrifugées à 4 °C à vitesse maximale pendant 5 min. Le culot bactérien est conservé et mis alternativement dans l'azote liquide puis dans un bain à 37°C (X 3) de façon à faciliter la lyse des cellules.

Ensuite, les culots sont resuspendus dans 400 ou 700 µl (phase exponentielle ou stationnaire respectivement) de solution de Bug Buster Master Mix (Novagen) et incubés pendant 2 à 3 h à température ambiante sous agitation lente. Après centrifugation (20 min, 20000 g, 4 °C), le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Le culot est resuspendu dans 200 µl de Bug Buster contenant de l'Urée (8 M) et agité lentement pendant 2 h à température ambiante. Le contenu en protéines des échantillons est déterminé par la méthode de Bradford (BioRad) en faisant une courbe étalon avec de la BSA ou de la BSA + 4 M d'Urée pour les protéines solubles et insolubles respectivement.

-Traitement des protéines avec un donneur de NO : les cultures (20 ml en phase exponentielle et 8 ml en phase stationnaire) sont centrifugées à 4°C à vitesse maximale pendant 5 min. Le culot bactérien est mis alternativement dans l'azote liquide puis dans un bain à 37°C (X 3) de façon à faciliter la lyse des cellules. Les culots sont ensuite resuspendus avec 400 ou 700 µl (phase exponentielle ou stationnaire respectivement) de Bug Buster Master Mix (Novagen) et incubés pendant 2 à 3 h à température ambiante sous agitation lente. Après centrifugation (20 min, 20000 g, 4°C), le surnageant est transféré dans un nouveau tube et incubé soit avec la SpermineNONOate (SpNN) soit le peroxy-nitrite (PN, Cayman Chemical) à différentes concentrations pendant une heure à température ambiante. La quantité de protéines totales est déterminée avec la méthode de Bradford comme indiqué précédemment (BioRad).

Analyse des protéines : 20 µg de protéines sont déposés sur un gel précoulé de polyacrylamide SDS-PAGE à gradient 4-12 % en suivant les recommandations du kit (Invitrogen). Pour une situation contrôle, 300 ng de nitroBSA commerciale (Cayman Chemical) sont déposés. Après migration (100 V, 1 h), les protéines sont transférées sur membrane PVDF. Après blocage de la membrane avec de la BSA 3 % (15 h, 4°C), la membrane est hybridée avec un anticorps monoclonal anti tyrosine nitratée ((Cayman Chemical) 2 µg/ml, 15 h, 4°C). L'immunodétection des protéines tyrosine nitratées est réalisée en utilisant un anticorps secondaire de souris conjugué à une peroxydase (dilué 10000X, Cayman Chemical) et en utilisant le système de détection ECLTM (GE Healthcare, Lifesciences).

3) Identification des protéines bactériennes tyrosine nitratées en culture

*** Immunoprécipitation des protéines tyrosine nitratées**

Les protéines extraites des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance traitées ou non avec 250 µM de SpNN ont été immunoprécipitées selon le protocole décrit par Cayman Chemical, Nitrotyrosine Affinity Sorbent. Les protéines immunoprécipitées sont divisées en 2 : la moitié est utilisée pour réaliser un Western blot anti nitro tyrosine et l'autre moitié est utilisée pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse.

*** Identification des protéines tyrosines nitratées par spectrométrie de masse**

Ces expériences ont été réalisées par Carole Pichereaux de la plateforme protéomique (IPBS) de Toulouse.

Digestion et Analyses Nano-LC MS/MS : après coloration des gels au bleu de coomassie, les bandes d'intérêt sont excisées. Les bandes sont incubées dans 60 µl d'une solution de trypsine (Trypsine 10 ng/µL dans du tampon NH₄HCO₃ 25 mM, Promega). Le mélange est incubé à 37°C sur la nuit. Les mélanges peptidiques sont analysés avec un système nano-LC-MS/MS, (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) couplé à un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Les spectres MS généraux (Survey scan MS) sont acquis dans l'Orbitrap sur la plage de masse 300–2000 *m/z* avec une valeur de résolution de 60,000.

Recherche en banque de données et analyses des données : la recherche en banque est traitée avec le logiciel Mascot Daemon (version 2.5, Matrix Science, London, UK) sur tous les fichiers bruts acquis pour chaque échantillon par le spectromètre de masse. La banque de recherche est la banque Sinorhizobium_INRA 20110121 (6,234 sequences; 1,923,681

residus). L'enzyme de digestion est la trypsine (spécificité de coupure après Lysine et Arginine, sauf devant la Proline). Les résultats Mascot sont analysés et validés avec le logiciel PROLINE (<http://proline.profi-proteomics.fr/>) développé dans l'équipe Protéomique et Spectrométrie de Masse des Biomolécules (IPBS-Toulouse). Le catalogue final des protéines présentes et validées est donné avec une estimation de FDR (False Discovery Rate) inférieur à 1 %.

ANNEXES

Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: not only a plant globin story

Papier publié dans Plant Signaling and Behavior

Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: Not only a plant globin story

Eliane Meilhoc^{1,2,*}, Pauline Blanquet^{1,2}, Yvan Cam^{1,2}, and Claude Bruand^{1,2}

¹INRA; Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM); UMR441; F-31326 Castanet-Tolosan, France; ²CNRS; Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes (LIPM); UMR2594; F-31326 Castanet-Tolosan, France

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*, *Medicago truncatula*, symbiosis, nitric oxide, flavohemoglobin, NO reductase

Nitric oxide (NO) is a gaseous signaling molecule which plays both regulatory and defense roles in animals and plants. In the symbiosis between legumes and rhizobia, NO has been shown to be involved in bacterial infection and nodule development steps as well as in mature nodule functioning. We recently showed that an increase in NO level inside *Medicago truncatula* root nodules also could trigger premature nodule senescence. Here we discuss the importance of the bacterial *Sinorhizobium meliloti* flavohemoglobin to finely tune the NO level inside nodules and further, we demonstrate that *S. meliloti* possesses at least two non redundant ways to control NO and that both systems are necessary to maintain efficient nitrogen fixing activity.

The symbiosis between legumes and rhizobia involves exchanges of signals between the bacterial and plant partners (for review¹⁻³). Rhizobia interact with legume roots on which they induce the formation of new organs, called nodules, wherein they differentiate into bacteroids able to reduce atmospheric nitrogen (N₂) into ammoniac (NH₃) to the benefit of the host plant. *Medicago truncatula* when inoculated with *Sinorhizobium meliloti*, forms indeterminate nodules which have a persistent meristem that yields a cylindrical shape to the nodule where 5 different zones can be distinguished, the zone III being the N₂-fixation zone. Contrary to the factors orchestrating the establishment of symbiosis, those involved in root nodule senescence have received little attention.

Nitric oxide (NO) is a small diffusible gas molecule known to influence many physiological functions in animal cells and which is also emerging as a signaling molecule in plants (for review⁴⁻⁶). Interestingly, NO is present at various stages of rhizobium-legume symbioses⁷⁻⁹ and both partners (bacteria and plant) were shown to participate significantly in NO synthesis, at least in mature nodules.^{10,11} NO was shown to have a beneficial role during infection, nodule development and mature nodule functioning.^{8,10} On the other hand NO was also shown to have inhibitory effects on nitrogenase,^{12,13} and we have recently shown that NO could also be a signal triggering senescence of *M. truncatula* nodules.¹⁴ These studies were mainly descriptive and the mechanisms by which NO is involved in these different steps remain to be deciphered. In plant systems, among the molecular mechanisms underlying NO signaling role, are the post-translational

modifications of target proteins. In that framework, at least two proteins from legumes are post-translationally affected by NO: leghemoglobin¹⁵ which helps to provide oxygen to the nitrogen-fixing bacteroids, and glutamine synthetase,¹⁶ a crucial plant enzyme responsible for the assimilation of NH₃ or ammonium by the plant. These may explain some of the deleterious effects of NO.

On the whole, NO seems to be involved in apparently conflicting events in symbiosis and one can suspect that concentration and/or localization has a major impact on NO function(s). Therefore, the NO level must be finely tuned in nodules in order for this molecule to play its positive role(s) without inducing a premature senescence.

Hemoglobins (Hbs) represent the prime candidate by which plant can modulate the level of NO.¹⁷ Indeed, studies performed on plants suggest that globins have functions other than oxygen transport, for example they could be involved in development and morphogenesis through local modulation of endogenous NO level in specific tissues (for review¹⁸). Three major families of Hbs have been described in plants: leghemoglobins (Lbs), non-symbiotic hemoglobins and truncated hemoglobins (for review^{17,19}). Interestingly, NO was first detected in complex with leghemoglobin within nodules of cowpea and pea.^{20,21} Lbs are abundant (up to mM range) in legumes and although having a key role in facilitating oxygen diffusion to N₂ fixing bacteria in root nodules, they now appear to have a function in scavenging NO,²²⁻²⁴ together with non-symbiotic and truncated hemoglobins. These molecules could be expected to be sufficient for controlling NO level in nodules.

*Correspondence to: Eliane Meilhoc; Email: Eliane.Meilhoc@toulouse.inra.fr

Submitted: 07/11/13; Revised: 07/26/13; Accepted: 07/26/13

Citation: Meilhoc E, Blanquet P, Cam Y, Bruand C. Control of NO level in rhizobium-legume root nodules: Not only a plant globin story. Plant Signaling & Behavior 2013; 8:e25923; <http://dx.doi.org/10.4161/jrn.25923>

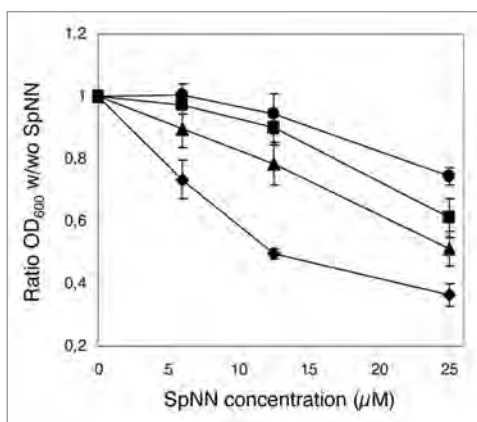


Figure 1. NorB is required to detoxify NO in *Sinorhizobium meliloti* culture. Different strains of *S. meliloti*: ● wt, ■ *norB*, ▲ *hmp*, ◆ *hmp norB*, were grown exponentially without or with various concentrations of Spermine NONOate (SpNN) as indicated. SpNN was added when OD₆₀₀ = 0.2 (optical density at 600 nm). Cell growth was measured 4.5 h after addition of the compound. Values shown on the figure are the ratios: OD₆₀₀ culture in the presence of NO donor/ OD₆₀₀ culture without NO donor. The experiment was repeated at least 3 times. The mean ± standard deviation is shown on the graph.

However a bacterial player involved in the control of NO level has also been identified. Indeed a *S. meliloti* flavohemoglobin (*hmp*) whose expression is induced both by microaerobic conditions and NO, has been shown to be involved in NO degradation and to be essential in maintaining efficient nitrogen-fixing symbiosis.^{14,25} Inoculation of *M. truncatula* plants with a *S. meliloti hmp* mutant led to a higher level of NO and early senescence in root nodules, even though plant hemoglobins were still proficient. This drew our attention to the importance of the bacterial protein in controlling NO balance inside nodules.¹⁴

Another candidate for NO detoxification in denitrifying rhizobia is the respiratory NO reductase (Nor) that catalyzes the reduction of NO into N₂O (nitrous oxide) in the denitrification process.²⁶ The *S. meliloti* enzyme is encoded by *norCBQD* genes. In soybean, a significant increase of NO level was observed in *norC* mutant as compared with wt nodules, only when the nitrate-treated plants were subjected to flooding.¹¹ In *Rhizobium etli* CFN42, the product of *norC* is required in vivo to detoxify NO.²⁷

To assess the involvement of the NO reductase in NO degradation in *S. meliloti*, we tested the sensitivity to NO of a *S. meliloti* 2011 *norB* mutant, grown in culture.²⁸ The results shown in Figure 1 indicate that the *norB* mutant is more sensitive to NO as compared with the wt strain, although to a lesser extent than the *hmp* mutant. A double mutant *norB hmp* was constructed and interestingly this strain was more sensitive to NO than each of either single mutant, an effect on cell growth being visible even when a very low concentration (6 µM) of NO donor was used.

Hence in *S. meliloti* at least two proteins Hmp and NorB, participate to NO degradation. The *norB* mutant was then used to inoculate *M. truncatula* Jemalong A17 plants. Interestingly, as the *hmp* mutant, the *norB* mutant led to a higher nodule NO

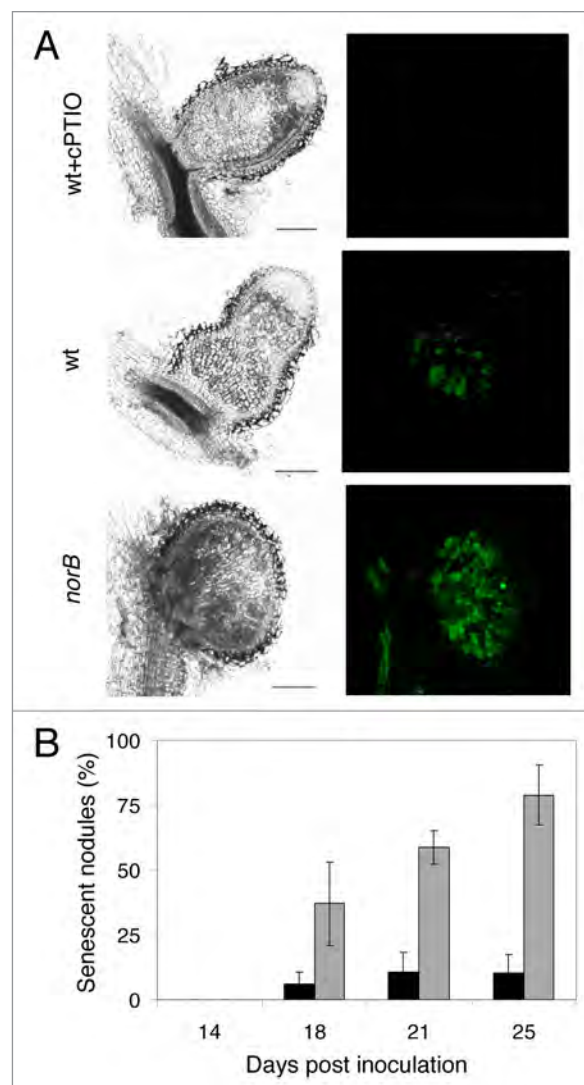


Figure 2. NorB is involved in NO degradation in *Medicago truncatula* root nodules. (A) Nitric oxide (NO) detection in *M. truncatula* root nodules by confocal microscopy. Nodule sections (65 µm) were obtained 19 d after inoculation with the wt or *norB* strains. Light and fluorescence micrographs of 4,5-diaminofluorescein-2-diacetate (DAF-2DA)-treated nodule sections are shown in the left and right parts of the figure, respectively. When indicated nodule slices were pretreated with 1 mM of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO) for 20 min before treatment with the DAF-2DA probe. The photographs shown are representative of 6 nodules from 4 different plants observed for each strain. This experiment was repeated 4 times. Scale bars: 250 µm. (B) Nodule senescence kinetics of *M. truncatula* infected with *S. meliloti norB* or wt strain. *M. truncatula* plantlets were inoculated with *S. meliloti* wt (black bars) or *norB* (gray bars) strain. Total and senescent nodules were counted in a series of ten plants at indicated time post-inoculation (a nodule was considered as senescent when half of its length was green). Two series of 10 plants were performed independently. The mean ± standard deviation is shown on the graph.

content as compared with wt elicited nodules (Fig. 2A). A premature senescence was also observed in *norB* nodules (Fig. 2B).

Overall, these experiments and others¹⁴ underline two essential features: 1) The *S. meliloti* flavohemoglobin is needed to control NO level in nodules even though plant hemoglobins are

present. We assume that NO freely diffuses between bacteroids and plant cells. An argument in favor of this hypothesis is that an increase in NO level in *hmp* mutant bacteroids affects the activity of the glutamine synthetase (H. Carvalho et al. unpublished results). Hence we can presume that plant hemoglobins could also function as a NO sink toward an excess of NO in bacteroids. Nevertheless Hmp might be devoted to the protection against NO of important bacterial proteins (nitrogenase, respiratory oxidase, enzymes from TCA cycle) and may not be replaced by plant globins. As a second hypothesis, Hmp could act prior to plant hemoglobins. In fact, *hmp* expression is dependent upon the major two-component regulator FixLJ (responding both to microoxia and the presence of NO) and occurs early in the symbiotic process. Hence it might be important to scavenge NO before it can nitrate hemes of leghemoglobins which then would be deficient in O₂ binding and therefore impair nitrogen fixation.¹⁵ Alternately, we could hypothesize that Hmp is more efficient in degrading NO than plant hemoglobins. Also, bacterial proteins could be more sensitive to NO than plant proteins and have to be protected by a bacterial cytosolic globin. 2) *S. meliloti* possesses at least two systems (Hmp and Nor) to degrade NO, which are not redundant. These proteins might not have the same function. It should be remembered that NorB is involved in the denitrification process of *S. meliloti* and although the importance of this pathway is not clearly elucidated in the bacteroids, its role in energy support must not be underestimated. In addition, Hmp is a soluble protein while NorB is located in the membrane, and one might suspect that they could act at degrading NO at different locations. Another explanation could be that NorB and Hmp have a role in NO degradation in different zones of the nodules. Indeed as already mentioned *hmp* is expressed early²⁵ in nodules and RNA-seq data obtained on micro-dissected nodules zones have shown that expression is induced in interzone II-III and

then is repressed in zone III (P. Gamas and C. Bruand, unpublished results). On the other hand, NorB is dependent upon the NO specific regulator NnrR, and expressed essentially in fixation zone (III) (also confirmed by RNA seq data). We could hypothesize that NnrR activation occurs only after NO has reached a significant level in nodules suggesting that Hmp and NorB will not function in the same conditions. Experiments are underway to answer these crucial issues.

Plant hemoglobins are being studied for years and their roles in NO storage and degradation are now emerging. The role of the bacterial response to NO in the symbiotic context has been underestimated but it becomes clear that bacterial proteins are essential to degrade NO and maintain efficient symbiosis. The main issues remain to understand i) the specific role of bacterial vs. plant globins ii) the reasons (s) why bacteria require several NO degradation systems. Other bacterial proteins such as thioredoxins or GSNO reductase which might indirectly participate to NO degradation /signalisation *in planta* and their function should be further explored in the symbiotic association. No doubt that future studies will unravel new bacterial proteins essential to modulate NO level and signaling in legumes-rhizobia symbiotic interaction.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported, in part, by funds from the Agence Nationale de la Recherche (BLAN 071_184783) and the Laboratoire d'Excellence (LABEX) TULIP (ANR-10-LABX-41). YC and PB were recipients of a Contrat Jeune Scientifique INRA. EM was supported by the National Institute for Applied Sciences (INSAToulouse, France). The authors wish to thank Anke Becker for providing *S. meliloti* strains.

References

1. Terpolilli JJ, Hood GA, Poole PS. What determines the efficiency of N(2)-fixing Rhizobium-legume symbioses? *Adv Microb Physiol* 2012; 60:325-89; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398264-3.00005-X>; PMID:22633062
2. Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:619-33; PMID:17632573; <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1705>
3. Oldroyd GE, Murray JD, Poole PS, Downie JA. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* 2011; 45:119-44; PMID:21838550; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132549>
4. Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 2008; 59:21-39; PMID:18031216; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092830>
5. Baudouin E. The language of nitric oxide signalling. *Plant Biol (Stuttg)* 2011; 13:233-42; PMID:21309969; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1438-8677.2010.00403.x>
6. Mur LA, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova GV, Hall MA, Harren FJ, Hebelstrup KH, Gupta KJ. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 2013; 5:pls052; <http://dx.doi.org/10.1093/aobpla/pls052>; PMID:23372921
7. Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 2006; 19:970-5; PMID:16941901; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-19-0970>
8. del Giudice J, Cam Y, Damiani I, Fung-Chat F, Meilhoc E, Bruand C, Brouquisse R, Puppo A, Boscari A. Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol* 2011; 191:405-17; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03693.x>; PMID:21457261
9. Pii Y, Crimi M, Cremonese G, Spena A, Pandolfini T. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol* 2007; 7:21; PMID:17488509; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-7-21>
10. Horchani F, Prévot M, Boscari A, Evangelisti E, Meilhoc E, Bruand C, Raymond P, Boncompagni E, Aschi-Smiti S, Puppo A, et al. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol* 2011; 155:1023-36; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.166140>; PMID:21139086
11. Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ. Production of nitric oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol Plant Microbe Interact* 2010; 23:702-11; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-23-5-0702>; PMID:20367476
12. Trinchant JC, Rigaud J. Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44:1385-8; PMID:16346155
13. Kato K, Kanahama K, Kanayama Y. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *J Plant Physiol* 2010; 167:238-41; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2009.08.006>; PMID:19733934
14. Cam Y, Pierre O, Boncompagni E, Hérouart D, Meilhoc E, Bruand C. Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. *New Phytol* 2012; 196:548-60; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04282.x>; PMID:22937888
15. Navasqués J, Pérez-Rontomé C, Gay M, Marcos M, Yang F, Walker FA, Desbois A, Abián J, Becana M. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:2660-5; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1116559109>; PMID:22308405
16. Melo PM, Silva LS, Ribeiro I, Seabra AR, Carvalho HG. Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiol* 2011; 157:1505-17; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.111.186056>; PMID:21914816
17. Gupta KJ, Hebelstrup KH, Mur LA, Igamberdiev AU. Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Lett* 2011; 585:3843-9; <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.036>; PMID:22036787

18. Hebelstrup KH, Shah JK, Igamberdiev AU. The role of nitric oxide and hemoglobin in plant development and morphogenesis. *Physiol Plant* 2013; 148:457-69; <http://dx.doi.org/10.1111/ppl.12062>; PMID:23600702
19. Hoy JA, Hargrove MS. The structure and function of plant hemoglobins. *Plant Physiol Biochem* 2008; 46:371-9; <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.016>; PMID:18321722
20. Maskall CS, Gibson JF and Dart PJ. Electron-paramagnetic-resonance studies of leghaemoglobins from soya-bean and cowpea root nodules. Identification of nitrosyl-leghaemoglobin in crude leghaemoglobin preparations. *Biochem J* 1977; 167: 435-445; PMID:23110.
21. Kanayama Y, Yamamoto Y. Formation of nitrosylleghemoglobin in nodules of nitrate-treated cowpea and pea-plants. *Plant Cell Physiol* 1991; 32:19-24
22. Herold S, Puppo A. Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules? *J Biol Inorg Chem* 2005; 10:935-45; <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-005-0046-9>; PMID:16267661; <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-005-0046-9>.
23. Shimoda Y, Shimoda-Sasakura F, Kucho K, Kanamori N, Nagata M, Suzuki A, Abe M, Higashi S, Uchiumi T. Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*. *Plant J* 2009; 57:254-63; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03689.x>; PMID:18801013
24. Vieweg MF, Hohnjec N, Küster H. Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta* 2005; 220:757-66; <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-004-1397-0>; PMID:15517353; <http://dx.doi.org/10.1007/s00425-004-1397-0>.
25. Meilhoc E, Cam Y, Skapski A, Bruand C. The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact* 2010; 23:748-59; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-23-6-0748>; PMID:20459314
26. Sánchez C, Cabrera JJ, Gates AJ, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. Nitric oxide detoxification in the rhizobia-legume symbiosis. *Biochem Soc Trans* 2011; 39:184-8; <http://dx.doi.org/10.1042/BST0390184>; PMID:21265770
27. Gómez-Hernández N, Reyes-González A, Sánchez C, Mora Y, Delgado MJ, Girard L. Regulation and symbiotic role of *nirK* and *norC* expression in *Rhizobium etli*. *Mol Plant Microbe Interact* 2011; 24:233-45; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-07-10-0173>; PMID:21043576
28. Pobigaylo N, Szymczak S, Nattkemper TW, Becker A. Identification of genes relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged mutants. *Mol Plant Microbe Interact* 2008; 21:219-31; <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-21-2-0219>; PMID:18184066

Sinorhizobium meliloti controls NO-mediated post-translational modifications of *Medicago truncatula* nodule proteins

Papier en cours de révision pour publication dans Molecular Plant Microbe Interactions

***Sinorhizobium meliloti* controls NO-mediated post-translational
modifications of *Medicago truncatula* nodule proteins.**

Pauline Blanquet^{1,2}, Liliana Silva³, Olivier Catrice^{1,2}, Claude Bruand^{1,2}, Helena
Carvalho³ and Eliane Meilhoc^{1,2}.

1. Institut National de la Recherche Agronomique, Laboratoire des Interactions Plantes-
Microorganismes, UMR441, Castanet-Tolosan, France
2. Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire des Interactions Plantes-
Microorganismes, UMR2594, Castanet-Tolosan, France
3. Laboratório de Biologia Molecular da Assimilação do Azoto, Instituto de Biologia
Molecular e Celular, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4150-180
Porto, Portugal

P. Blanquet and L. Silva contributed equally to the work

Author for correspondence:

Eliane Meilhoc

Tel: +33 561285320

Email: Eliane.Meilhoc@toulouse.inra.fr

Abstract

Nitric oxide (NO) is involved in various plant-microbe interactions. In the symbiosis between the soil bacterium *Sinorhizobium meliloti* and the model legume *Medicago truncatula* NO is required for an optimal establishment of the interaction but is also a signal for nodule senescence. Little is known about the molecular mechanisms responsible for NO effects in the legume-rhizobia interaction. Here we investigate the contribution of bacterial response to NO on a plant protein post-translational modification in nitrogen fixing nodules. We made use of different bacterial mutants to finely modulate NO levels inside *M. truncatula* root nodules and examine the consequence on tyrosine nitration of the plant Glutamine synthetase (GS), a protein responsible for assimilation of the ammonia released by nitrogen fixation. Our results reveal that *S. meliloti* possesses at least four different proteins which avoid inactivation of plant enzyme activity via NO-mediated post-translational modifications. This is the first demonstration that rhizobia can impact the course of nitrogen fixation by modulating the activity of a plant protein.

Key words: Glutamine synthetase, *Medicago truncatula*, nitric oxide, NnrS, *Sinorhizobium meliloti*, symbiosis, tyrosine nitration.

Introduction

Leguminous plants are capable of growing under nitrogen limiting conditions due to their ability to establish an endosymbiosis with soil bacteria called rhizobia. Rhizobia interact with legume roots on which they induce the formation of new organs, called nodules, wherein they differentiate into bacteroids able to reduce atmospheric nitrogen (N_2) into ammonia (NH_3) to the benefit of the host plant. In exchange, plants provide bacteria with a niche as well as energy in the form of carbon sources. Rhizobium-legume symbioses have been characterized in detail at the cytological and genetic levels, and a number of bacterial and plant genes required for bacterial infection, nodule formation and functioning have been identified (Jones *et al.*, 2007; Oldroyd *et al.*, 2011; Terpolilli *et al.*, 2012).

Nitric oxide (NO), a well-known diffusible gas signal molecule in mammalian cells, is emerging as a molecule of prime importance in plant biology (Mur *et al.*, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008; Mur *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2014). Interestingly NO is present at various stages of rhizobium/ legume symbioses (Meilhoc *et al.*, 2011; Wang & Ruby, 2011). Indeed NO was detected (either directly using a NO-specific fluorescent probe, or indirectly using a rhizobium NO-biosensor strain or through the detection of nitrosyl-leghemoglobin) in nitrogen-fixing nodules of *Medicago truncatula*, *Medicago sativa*, *Lotus japonicus* and soybean (Mathieu *et al.*, 1998; Baudouin *et al.*, 2006; Pii *et al.*, 2007; Nagata *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2010). NO is also present during the first steps of the interaction. Indeed a transient NO production was detected on the surface of *M. sativa*, *L. japonicus* and *Trifolium repens* roots 4 hours after inoculation, and only when the cognate bacterial symbionts were used (Nagata *et al.*, 2008). NO was also detected in infected *M. truncatula* root hairs, both in the colonized curls and along the infection threads as well as in cells of nodule primordia (del Giudice *et al.*, 2011).

The role played by NO in symbiosis is still puzzling but it is emerging that NO might have opposite effects depending on the step of the interaction. Indeed, by using genetic and pharmacological approaches it was shown that NO has a beneficial role during the first steps of symbiosis since it is important for optimal infection and/or nodulation (del Giudice *et al.*, 2011). It has also a positive role in the mature nodule where it could serve a respiratory function especially in conditions of oxygen limitation (for instance under flooding) (Horchani *et al.*, 2011). On the other hand, NO has a negative effect in mature nodules since it has been shown to inhibit nitrogenase activity (Trinchant & Rigaud, 1982; Kato *et al.*, 2010) and has been suggested to be a signal in physiological or stress-induced nodule senescence (Cam *et al.*, 2012).

It can be suspected that the effect of NO will depend upon its localisation and concentration within the nodule. NO levels result from a balance between its synthesis and its degradation. Nitrate reductase has been shown to be an important source of NO in mature nodules (Horchani *et al.*, 2011) and both symbiotic partners (bacteria and plant) were shown to participate significantly in NO synthesis in determinate (soybean) as well as indeterminate (*Medicago*) nodules (Sanchez *et al.*, 2010; Horchani *et al.*, 2011). On the other hand plant hemoglobins (non-symbiotic hemoglobins but also leghemoglobins or truncated hemoglobins) have been shown to be involved in NO degradation (Gupta *et al.*, 2011). We have also shown that two *S. meliloti* proteins, the flavohemoglobin (Hmp) and the NO reductase (Nor) are major NO detoxifying enzymes essential in maintaining a balanced NO concentration and an efficient symbiosis (Cam *et al.*, 2012; Meilhoc *et al.*, 2013). Furthermore, we have identified two genes (*nnrS1* and *nnrS2*), which encode heme and copper containing membrane proteins whose homologues in *Vibrio cholerae* and *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 have been shown to be important in resisting to nitrosative stress in culture (Stern *et al.*, 2012, Arai *et al.*, 2013). Hence endosymbiotic bacteria like many microbes and especially pathogens, possess

several different systems to degrade NO as a first defense strategy to survive to this potentially toxic molecule.

Even though little is known about the molecular mechanisms responsible for NO effects in legume/rhizobia interactions, it is now recognized that NO not only influences gene expression but could also act through post-translational modifications of target proteins (Besson-Bard *et al.*, 2008; Astier & Lindermayr, 2012). Indeed a large number of studies are now dedicated to the two main protein post-translational modifications which are specific to NO action/signaling, i.e. S-nitrosylation and tyrosine nitration. About 15 S-nitrosylated proteins have been well characterized in plants, many of them being key proteins of the signal transduction pathway that leads to plant resistance against pathogens, drawing a first outline of the involvement of NO in plant immune signaling. In the model symbiotic system *Sinorhizobium meliloti*/ *M. truncatula*, about 80 S-nitrosylated proteins have been identified in mature nodules but the effect of S-nitrosylation on the protein activity or/and function remains to be determined (Puppo *et al.*, 2013). There have been relatively few studies on tyrosine nitration possibly because of the irreversible nature of this modification which makes it a less attractive regulatory switch, although some evidence of enzymatic and non-enzymatic mechanisms of denitration is available (Abello *et al.*, 2009). Interestingly protein tyrosine nitration appears as a prevalent post-translational modification throughout pea root development and intensifies during senescence (Begara-Morales *et al.*, 2013). Very recently, it has been shown that leghemoglobin, an abundant heme protein of legume nodules, is tyrosine-nitrated in bean and soybean (Sainz *et al.* 2015). In *M. truncatula* only one protein, glutamine synthetase (GS) has been fully characterized as a target of tyrosine nitration in nodules (Melo *et al.*, 2011). This protein is of major importance in symbiosis because it is responsible for the assimilation of the ammonia released by bacterial nitrogen fixation into glutamine which is then used as a building block for all other nitrogen-containing compounds

in the plant. The effect of NO on protein modification and enzyme activity has been previously described and it has been shown that tyrosine nitration negatively impacts GS activity (Melo *et al.*, 2011).

The deeper knowledge of the role of NO in plant-symbiont interactions is still relatively limited by the lack of plant mutants with altered NO production. Therefore experimental strategies rely on the use of NO donors which are compounds that release NO when applied to biological systems and are supposed to mimic an endogenous NO-related response. However it is often difficult to discriminate between physiologically relevant and pharmacological effects depending upon the nature of NO donor, application method as well as possible effects of spent donor products (Filippou *et al.* 2012; Prochazkova *et al.* 2011). In this work we described two new *S. meliloti* mutants affecting NO level in *M. truncatula* root nodules and triggering premature senescence of these organs. Thus we made use of a range of bacterial mutants to finely modulate the endogenous levels of NO inside the nodules and we show that tyrosine nitration of the plant protein glutamine synthetase correlates with NO concentration. These data imply that bacterial proteins may indirectly control plant protein NO-induced post-translational modifications.

Results

The *S. meliloti* *nnrS1* and *nnrS2* mutants are affected in the maintenance of an efficient symbiosis with *M. truncatula*.

NnrS was first identified in *Rhodobacter sphaeroides* (Bartnikas *et al.*, 2002) and displays a topological conservation with nitric oxide reductases (NORs) and heme-copper oxidases (HCO) (Sousa *et al.*, 2012; Pei *et al.*, 2014). Experimental studies and genomic context analyses suggest that the NnrS protein family could function in the denitrification pathway and/or detoxification of reactive molecules such as NO. Thus NnrS has been shown to be part

of the arsenal defence of *Vibrio cholerae* and *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 against the toxic effect of NO (Stern *et al.*, 2012, Arai *et al.*, 2013). In addition, gene disruption experiments showed that NnrS is important in *V. cholerae* and *Neisseria meningitidis* for colonization of intestines in presence of NO, suggesting a role for NnrS in the defense against NO (Stern *et al.*, 2012, 2013; Jamet *et al.*, 2013).

To test whether NnrS proteins have a biological function in symbiosis we used *nnrS1* and *nnrS2* mutant strains to inoculate *M. truncatula* plantlets. We have previously shown that bacterial mutants of the NO degrading enzymes Hmp and Nor display an early nodule senescence phenotype correlating with an increased NO level inside nodules (Cam *et al.*, 2012; Meilhoc *et al.*, 2013). Nodule senescence is characterized macroscopically by a colour shift from pink to green associated with degradation of the plant leghemoglobin. Hence, to evaluate the senescence phenotype, we monitored the colour of nodules over a period of 6 weeks post-inoculation (wpi). As a comparison, we monitored in parallel the senescence of nodules induced by *hmp* and *norB* mutants. As already published, plants inoculated with these mutants displayed an early nodule senescence phenotype, since the first senescent nodules appeared at 19 dpi as compared to 24 dpi for the WT strain (Fig. 1). In addition, the rate of appearance of senescent nodules was faster with the mutants than with the WT strain. Interestingly, senescent nodules appeared earlier with the *nnrS1* mutant as compared to the *hmp* and *norB* mutants. Indeed at 17 dpi, as many as 11 % of the nodules were already senescent and one week later all the nodules were senescent. The symbiotic phenotype of the *nnrS2* mutant was intermediate between the WT and the *hmp* or *norB* phenotypes. Actually, the first senescent nodules appeared only 3 wpi and the senescence kinetics was slower than with the other mutants. However, all the *nnrS2*-elicited nodules were senescent 5 wpi.

We observed a good correlation of the nodule senescence phenotype with the plant shoot dry weight (Fig. 2). Indeed plants inoculated with the *nnrS1* mutant displayed a lower

average dry weight than those inoculated with the WT strain (40% reduction), comparable to that obtained with *norB* or *hmp* mutant strains. *nnrS2* had only a weak but significant effect on the plant shoot dry weight.

In order to better characterize the nodule senescence process induced by *nnrS* mutant strains, we performed microscopic analyses of sections of WT-, *nnrS1*-, *nnrS2*-elicited nodules at 3 wpi. Thin longitudinal sections of wild type nodules stained with toluidine blue showed the typical zonation of indeterminate nodules: the meristem (ZI), the infection zone (ZII), the interzone II-III with cells containing starch granules (stained in dark purple) and a large fixation zone (ZIII) with mainly healthy cells (Fig. 3a). As expected, no senescence zone was visible in the WT nodules at this stage. *nnrS1*-elicited nodules displayed an extensive senescence zone (poorly-stained cells, ZIV) (Fig. 3b). Nodules elicited by the *nnrS2* mutant generally did not present a marked senescence zone and were comparable at 3 wpi to WT nodules, although some senescent cells were occasionally observed (Fig. 3c).

Transmission electron microscopy (TEM) was used to identify ultra structural changes in nodule cells. We performed similar studies with *hmp* and *norB* elicited nodules as controls. Only results obtained with *nnrS1* nodules are shown on Fig. 3d-i. The pictures show bacteria properly released from the infection threads in ZII (Fig. 3d,e) and the presence of elongated bacteroids in ZIII (Fig. 3f). Hence, bacteroid differentiation does not seem to be affected in *nnrS1* or *nnrS2* mutants. Similar observations were made in nodules occupied by *hmp* or *nor* mutants (Fig. S1).

TEM pictures from the central zone of the *nnrS1*-elicited nodules revealed cells with lots of vesicles and membrane debris as expected for a ZIV (Fig. 3g,h). A saprophytic zone was observed where infection threads appeared to be enlarged, releasing a large number of rhizobia into the degraded infected cells (Fig. 3i) as it was also the case in *hmp* and *norB* mutant (Fig. S1) or in other early senescence mutants (Timmers *et al.*, 2000). This was in

striking contrast to WT and *nnrS2*-elicited nodules, in which infected cells were filled with intact symbiosomes and did not show any signs of degradation at this time point (data not shown).

To investigate the viability of the mutant bacteroids, we incubated nodule sections with the live/dead backlight TM probe (Invitrogen). Living bacteria are stained green by Syto 9 whereas dead bacteria are stained red by Propidium iodide (PI). At 3 wpi WT as well as *nnrS2* bacteroids fluoresced green indicating that these bacteroids were viable (Fig. S2). As already described (Cam *et al.*, 2012) PI red staining was observed with the *hmp* bacteroids suggesting their rapid death in plant cells. A similar observation is reported here for *norB* bacteroids. It is interesting to note that *nnrS1* nodules were poorly stained and displayed a dark proximal zone probably due to their more pronounced senescence phenotype (Fig. S2). Residual green staining in this zone was likely due to saprophytic bacteria or infection threads containing bacteria (Timmers *et al.*, 2000).

Together these results show that *nnrS1* and to a lower extent *nnrS2* mutant strains display an early nodule senescence phenotype. The *nnrS2* mutant did not induce major subcellular alterations at 3 wpi, in agreement with a nodule senescence phenotype appearing later than with the other mutants (*nnrS1*, *hmp* or *norB*). Finally bacteroids made by *nnrS1* mutant strains are not affected in their differentiation but die rapidly in the plant cells.

NO content inside the nodule depends upon the strain used to inoculate *M. truncatula*.

Since *nnrS1* and *nnrS2* mutants are defective in bacterial NO resistance we wondered whether their early nodule senescence phenotype correlates with a high NO content in nodules. We therefore performed a quantitative assay based on the detection of NO diffusing from entire nodules with a non-permeable NO-specific fluorescent dye (DAF-2) (Horchani *et al.*, 2011). The results obtained for nodules collected at 14, 18 and 26 days are shown on Fig. 4. As

previously described, we observed a 36% increase in the NO content of *hmp*-elicited nodules collected at 18 dpi in comparison to WT nodules (Cam *et al.*, 2012). A slight increase was already detectable at 14 dpi (12% increase) and the maximum increase (100%) was detected at 26 dpi. The results obtained for the *norB* mutant were comparable. Interestingly, in *nnrS1*-elicited nodules, a high increase (39%) of the NO level was already observed at 14 dpi, to reach 50% at 18 dpi and 100% at 26 dpi. On the other hand, an increase (50%) of the NO level in nodules elicited by the *nnrS2* mutant strain was only observed at 26 dpi.

These results were confirmed qualitatively using a complementary approach based on the use of a reporter plasmid carrying a transcriptional fusion to the promoter of *SMa1289*, an *S. meliloti* gene specifically induced by NO (de Bruijn *et al.*, 2006; del Giudice *et al.*, 2011; Meilhoc *et al.* 2010). The wild type, as well as *nnrS1* and *nnrS2* mutant strains carrying this plasmid were used to inoculate *M. truncatula* plantlets. Expression of the fusion was assessed at 3 and 4 wpi on nodule sections by X-gal staining and microscopic analysis (Fig. S3). Blue staining was observable only at 4 wpi in WT nodules. A strong blue staining was already visible at 3 wpi and was very intense at 4 wpi in *nnrS1* nodules. In *nnrS2* nodules, blue staining was mostly detectable in the interzone II-III at 3 wpi and spread to few cells in the ZIII at 4 wpi.

These results confirm that the *nnrS1* mutant forms nodules containing a higher amount of NO as compared to the WT strain. The NO level in nodules occupied by the *nnrS2* mutant was lower than in *nnrS1* nodules and the increase seemed restricted to the cell layers in interzone II-III. Thus, we have now a collection of bacterial mutants giving rise to a broad range of nodule NO levels when used to infect *M. truncatula* plants.

Tyrosine nitration of the plant glutamine synthetase is enhanced in *hmp* and *nnrS* elicited nodules

244 We have identified four *S. meliloti* mutants (*hmp*, *norB*, *nnrS1*, *nnrS2*), which result in a high
245 NO content inside the nodules. Interestingly each mutant triggers an early senescence
246 phenotype even though NO protecting plant proteins (i.e hemoglobins) are functional. One
247 hypothesis is Hmp, Nor and NnrS are dedicated to protect essential bacterial proteins such as
248 nitrogenase or TCA cycle enzymes which are known to be sensitive to NO (Trinchant &
249 Rigaud, 1982; Kato *et al.*, 2010; Stern & Zhu, 2014). Nevertheless, we wondered whether
250 plant proteins might also be affected.

251 To evaluate whether mutations in the bacterial NO-related proteins have repercussions
252 on the plant side, we quantified glutamine synthetase (GS) nitration in nodules formed by the
253 different rhizobial mutants (*hmp*, *nnrS1* and *nnrS2*) using a Sandwich Enzyme-Linked
254 Immunosorbent Assay (ELISA) (Fig. 5). Indeed, to date, GS is the only protein which has
255 been shown to be post-translationally modified by NO (through tyrosine nitration) in root
256 nodules of *M. truncatula* (Melo *et al.*, 2011).

257 GS tyrosine nitration, polypeptide content and enzymatic activity were compared in
258 nodules elicited by WT, *hmp*, *nnrS1* and *nnrS2* mutant strains at 3 wpi as well as nodules
259 formed by an *hmp* overexpressing strain (*hmp++*), previously shown to delay nodule
260 senescence and to decrease the NO content inside nodules (Cam *et al.*, 2012).

261 GS nitration was found to be significantly increased in nodules induced by the *hmp*
262 (Fig. 5c) and *nnrS1* (Fig. 5f) mutant strains, when compared to the WT, correlating with
263 decreased GS activity (Fig. 5a and Fig. 5d respectively). Conversely, GS tyrosine nitration
264 was significantly reduced and GS activity was increased in nodules induced by the rhizobial
265 strain overexpressing *hmp* (Fig. 5c and Fig. 5a). The GS polypeptide content of both the
266 cytosolic and the plastid located isoenzymes was also influenced in nodules formed by the
267 different rhizobial strains (Fig. 5b,e). When the endogenous nodule NO content was higher,
268 which is the case of *hmp*- and *nnrS1*- elicited nodules, both the cytosolic (GS1) and the

plastid located (GS2) polypeptide content were reduced, when compared to WT nodules, whereas in *hmp*⁺⁺-induced nodules both GS1 and GS2 polypeptides were slightly more abundant. GS nitration and enzyme activity were unaffected in the nodules formed by the *nnrS2* mutant which is consistent with the fact that the NO content was not significantly modified at this time point in the *nnrS2*-occupied nodules (see Fig. 5d,f).

As a whole our results indicate that GS nitration is positively correlated with the NO content inside the nodules, suggesting that the bacterial proteins under study are important to prevent NO-mediated GS inactivation.

Discussion

NO produced during infection of plant or animal cells by pathogens plays a key role in host defense mechanisms. In symbiotic interactions, the role of NO is still obscure although NO was shown to be present at all stages of the interaction. Hence in both types of interactions, bacteria are in contact with NO and must develop a defense based on different strategies (Bowman *et al.*, 2011; Stern & Zhu, 2014). The most obvious strategy to cope with nitrosative stress is to directly remove NO. Several bacterial enzymes are known to convert NO into less toxic molecules such as nitrate or nitrous oxide. *S. meliloti* is the unique rhizobium for which a comprehensive transcriptomic analysis has been performed to identify the whole NO stimulon (Meilhoc *et al.*, 2010). Among the genes whose expression is upregulated by NO, two have been shown to be involved in NO degradation namely the flavohemoglobin (*hmp*) and the nitric oxide reductase (*nor*). We have already shown that both proteins are important in symbiosis since inoculation of the model legume *M. truncatula* with bacteria mutated in one of these proteins caused an early senescence of nodules (Cam *et al.*, 2012; Meilhoc *et al.*, 2013).

Here we started a characterization of two new players (NnrS1 and NnrS2) in *S. meliloti* NO resistance. Both genes belong to the NO stimulon (Meilhoc *et al.*, 2010) and their expression is dependent upon the NO-specific regulator NnrR. The results presented here show that *nnrS* mutant strains when inoculated to *M. truncatula*, produced nodules containing higher NO content than the wild type. This was verified using two complementary strategies: the first one made use of specific fluorescent dyes (DAF-2DA on nodule sections (data not shown) or DAF-2 for quantitative assays on entire nodules), the second was based on the use of a *S. meliloti* NO biosensor strain (del Giudice *et al.*, 2011). The amount of NO measured in the *nnrS1*-elicited nodules was higher than that measured in the *hmp* or *norB* nodules at 14dpi and comparable after 18dpi. In addition, both *nnrS* mutant strains have been found to be more sensitive to NO when grown as free-living cells as compared to a WT strain (P. Blanquet, in preparation).

Altogether these results suggest that *S. meliloti nnrS1* and *nnrS2* mutants are affected in their capacity to degrade NO. However we cannot rule out the possibility that NnrS1 and/or NnrS2 could be involved in functions other than NO degradation. Indeed it was recently suggested in *V. cholerae* that NnrS does not remove NO but might instead protect the cellular iron pool from NO damage (Stern *et al.*, 2013). NnrS1 and NnrS2 from *S. meliloti* display a similar identity with the protein from *V. cholerae* (29.7 and 28.1 % respectively) and one or both proteins could share a similar role. *nnrS2* is the first gene of an operon whose second gene (*smal195*) encodes a protein presenting homologies with YtfE proteins involved in the repair of NO damages to iron sulfur clusters (Justino *et al.*, 2007; Justino *et al.*, 2009). This gene neighborhood further supports their functional association.

Hence *S. meliloti* possesses at least four systems (Hmp, Nor, NnrS1 and NnrS2) to combat NO, which are not redundant. These proteins might not have the same role and/or not function in the same conditions inside nodules. Indeed they have different localization in the

bacterial cell (Hmp is cytosolic while the other are membran proteins) and on the other hand they display a different expression pattern within the different zones of the nodules (Meilhoc *et al.*, 2013; Roux *et al.*, 2014).

A rise in NO content inside nodules, caused by inoculation of plants with bacterial mutants deficient in NO degradation, triggers early nodule senescence. Our results show that in these conditions, only the bacteroid viability but not their release nor their differentiation in plant cells were affected. An intriguing question is whether bacteroid death is due to direct NO toxicity, or an indirect consequence of nodule senescence induction. The second hypothesis might be favored since bacteroids are in a non-growing state close to that of stationary phase bacteria (Capela *et al.* 2006) which are more resistant to NO than cells in exponential growth phase (E. Meilhoc, unpublished observations). In addition, the NO concentration inside the nodules was estimated to be at the μM range (Meilhoc *et al.*, 2010) which is lower than the NO concentration assayed in culture. However we cannot completely exclude the possibility that the nodule micro-environment contains local elevated levels of NO or that the symbiosome membrane is very sensitive to NO as previously suggested (Puppo *et al.*, 2005).

Hence, the interesting issue is why these bacterial proteins are so important for avoiding early nodule senescence and how they contribute to the maintenance of the symbiosis. The precise molecular mechanisms underlying the role of NO on nodule senescence are still poorly understood but it is now recognized that NO can act by modifying target proteins via post-translational modifications (PTMs). The major NO-dependent PTMs are i) the interaction of NO with metalloproteins (metal-nitrosylation) ii) the modification of tyrosine residues resulting in the formation of 3-nitrotyrosine, iii) the formation of nitrosothiol groups on cysteine residues (for a review Astier & Lindermayr, 2012). These modifications occur in bacteria and in plant cells and interestingly these different types of NO-mediated

PTMs have been identified during symbiotic interactions. Indeed, leghemoglobin is NO metal-nitrosylated in nodules of soybean and this property was used to indirectly monitor NO levels (Sanchez *et al.*, 2010). On the other hand, recent studies revealed that leghemoglobin is also tyrosine nitrated (Sainz *et al.* 2015). In addition, about 80 proteins have been shown recently to be S-nitrosylated in nodules of *M. truncatula* (Puppo *et al.*, 2013). Finally one *M. truncatula* protein, glutamine synthetase (GS), has been well characterized as a target of tyrosine nitration in root nodules (Melo *et al.*, 2011). GS exists in the plant as a number of isoenzymes that are located both in the cytosol (GS1) and in the plastids (GS2) and are encoded by a small family of genes (4 in *M. truncatula*). MtGS1a encodes the isoenzyme responsible for assimilation of the ammonia released by nitrogen fixation (Carvalho *et al.*, 2000a; Carvalho *et al.*, 2000b). Interestingly, MtGS1a is subjected to tyrosine nitration and this modification inhibits enzyme activity. This nitration appears to be somehow specific to the root nodules as it was not observed in *M. truncatula* roots and it has been suggested that it could be related with boosting the nodule antioxidant responses (Melo *et al.*, 2011).

We show here that at 3 wpi, GS tyrosine nitration is about 2 and 2.5-fold increased in nodules formed by *hmp* and *nnrS1* mutants respectively, as compared to WT nodules. This increase in GS nitration is associated with a decrease in GS activity in both cases. Conversely, Hmp over-expression in bacteria lead to a decrease in GS nitration accompanied by an increase (about 50%) in GS activity. Hence, the first major conclusion is that bacterial proteins involved in NO degradation are not only dedicated to protect bacterial proteins (for instance nitrogenase) from the effect of NO but also protect plant proteins from being inactivated by NO via post-translational modifications. A similar observation was made in *Bradyrhizobium japonicum* where an increase in leghemoglobin metal-nitrosylation was observed in nodules occupied by a bacterial *nor* mutant, especially under flooding stress conditions (Sanchez *et al.*, 2010; Navascues *et al.*, 2011).

Therefore in nodules, the protection of plant proteins against NO is not an exclusive task of plant hemoglobins, bacterial and plant proteins could have an additive effect on the protection from the toxic effects of NO, or alternatively bacterial proteins could be more efficient or more resistant to NO than plant hemoglobins. GS tyrosine nitration was reported to be increased in nodules elicited by a *fixJ* (nitrogen fixing deficient) strain indicating a link between nitrogen fixation deficiency and the regulation of GS activity by tyrosine nitration (Melo *et al.*, 2011). Since the expression of *hmp* is regulated by FixJ (Meilhoc *et al.* 2010) an alternative explanation could be that the NO content is augmented in *fixJ*-elicited nodules, leading to an increase in GS nitration.

Altogether our results show that the rate of GS tyrosine nitration is directly correlated with the NO levels inside the nodules and that the control of NO concentration by bacterial proteins limits nitration and subsequent inactivation of GS. Protein nitration is a chemical reaction generally due to the production of peroxynitrite (ONOO⁻) from NO and superoxide ions. We cannot exclude that ROS level is also increasing in nodules occupied by the different bacterial mutants, hence contributing to increase protein tyrosine nitration.

It is tempting to speculate that GS tyrosine nitration can be responsible for the initiation of nodule senescence. Indeed an increased level of NO and reactive oxygen species in ageing nodules (Puppo *et al.*, 2005; Navascues *et al.*, 2011) could cause GS inhibition leading to a reduction in ammonia assimilation and induction of the senescence program as an end result. However it seems unlikely that GS inhibition is the primary cause of nodule senescence because transgenic plants specifically downregulated for MtGS1a in root nodules showed only about 60% of the wild type nitrogen fixation activity without presenting visible signs of nodule senescence 21 days post inoculation (H. Carvalho, personal communication). Hence, we cannot exclude that other plant and/or bacterial proteins are also modified by an increase of NO and are responsible for induction of senescence. Our goal will be to identify

such proteins to help us better understand not only the natural process of nodule senescence but also the process of stress induced senescence where NO is also a key player.

In conclusion, this work identifies bacterial proteins important for maintaining an efficient symbiosis by contributing to neutralize the deleterious effects of NO, preventing the NO-mediated inactivation of glutamine synthetase and possibly other proteins important for root nodule functioning, and in this way prevent early nodule senescence and maintain nitrogen fixation activity. We demonstrate, for the first time, that the bacteria can impact the course of nitrogen fixation by modulating the activity of a plant protein. Our future goal is to identify other proteins involved in this process to help us better understand not only the natural process of nodule senescence but also the process of stress induced senescence where NO is a key player. Nodule senescence is an overlooked step of nitrogen fixing symbiosis and needs to be better understood as this knowledge can be used to extend the nitrogen fixation period with obvious implications for forage legume yield.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmid constructions and growth conditions

The bacterial strains and plasmids are listed in the Table 1.

S. meliloti strains were grown in Luria-Bertani medium supplemented with 2.5 mM CaCl₂ and 2.5 mM MgSO₄ (LBMC). NO resistance assays were performed in Vincent minimal medium (VMM) as described in Meilhoc *et al.* 2010.

When necessary, antibiotics were added in the medium at the following concentrations: streptomycin 100 µg/ml; neomycin 100 µg/ml and gentamycin 40 µg/ml.

All plasmid constructions were performed in *Escherichia coli* DH5α. To construct the *nrrS2* mutant, the 5' and 3' flanking regions (326 and 317 bps respectively) of *nrrS2* were amplified by PCR by using genomic DNA of the strain GMI11495 as template and the oligonucleotides

OCB1104(TGGATCCGAGCACCGAGGAT)/OCB1105(TCGCGAGCTCGCGCGATAAA)
 and OCB1106(ACAGTCGACGAGCCACATGA)/OCB1107
 (AGGATCCCTGCTAAGTCGTG) as primers, respectively. The PCR fragments were then
 ligated with pGEM-T yielding plasmids pGEM 5'UTR and pGEM 3'UTR respectively (Table
 1). The cloned *S. meliloti* regions were verified by DNA sequencing. The plasmids were
 digested with either the enzymes *Sall/Bam*HI or *Bam*HI/*Sac*I to collect the 3' and 5'UTR
 DNA fragments respectively. The UTRs were ligated with pJQ200mp19 (Table 1) digested
 by *Sall* and *Sac*I yielding pJQ200mp19 5'3'UTR *nnrS2* (Table 1).
 The plasmid was introduced into *S. meliloti* GMI11495 by triparental mating using pRK2013
 as helper with subsequent selection for antibiotic resistance. Single-crossover genomic
 integration of the pJQ200mp19 5'3'UTR*nnrS2* plasmid was generated by selecting for Gm
 resistance. The resulting strains were then grown in the absence of antibiotic, and cells having
 lost the plasmid by a second recombination event were selected by plating on LBMC medium
 supplemented with 5% sucrose as the plasmid carries the *sacB* gene which is lethal for *S.*
meliloti in the presence of sucrose. A gentamycin sensitive clone that grew on sucrose
 containing medium was selected and the deletion of *nnrS2* was verified by PCR using
 OCB905(GATTTCTGAACCCGGACAA)/OCB 1467 primers (CAACACCGTCGCAGC).

Plant growth conditions

Medicago truncatula Jemalong A17 plantlets were usually grown in test tubes containing
 solid Farhaeus medium without nitrogen source as described in (Lullien *et al.*, 1987; del
 Giudice *et al.*, 2011) *S. meliloti* strains grown on LBMC plates were resuspended in sterile
 water to a final absorbance OD₆₀₀= 0.001 and plant roots were inoculated with 200 µl of the
 bacterial suspension. For GS tyrosine nitration assays, plants of *M. truncatula* Jemalong J5
 were grown in aeroponic conditions under 16 h light (22°C)/8 h dark (19°C) cycles and under

a light intensity of 150-200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in a growth medium supplemented with ammonium nitrate as described by (Lullien *et al.*, 1987). For nodule induction, the growth medium was replaced with fresh medium lacking a nitrogen source three days before inoculation with either *S. meliloti* GMI11495 (WT) or the mutant strains: *hmp* (CBT613), *nnrS1* (CBT619), *nnrS2* (CBT1418) and *hmp*⁺⁺ (CBT602). Nodules were harvested at 21 days after inoculation. All plant material was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C.

Assessment of nodule senescence

Nodule color shift observation

Series of 10 plants were inoculated with each bacterial genotype (WT or mutant). Every 2 days, nodules were observed under a binocular microscope. A nodule was considered to be senescent when a green area appeared at the nodule base. In each series, the numbers of senescent and total nodules were counted and the percentage of senescent nodules was calculated. The experiment was repeated three times, the mean of the percentage of senescent nodules was calculated from these 3 series.

Nodule electron microscopy and toluidine blue staining

3 week-old nodules were fixed in 2.5% Formaldehyde, 1.5% Glutaraldehyde, in potassium phosphate Buffer (KPi) 0.1M, pH 7.5, with triton X-100 (0.01%) for 45 min under vacuum and then let overnight at room temperature. Nodules were washed 5 times for 20 minutes in KPi buffer, 5 times in UltraPure water. The last wash was performed overnight. Nodules were then post-fixed in 1% OsO₄ solution in water (2h). After post-fixation, nodules were carefully washed in ultrapure water for several days then dehydrated in successive ethanol bathes (30, 50, 70, 95, 100%) and acetone (100%) before impregnation and embedding in Spurr's resin (Electron Microscopy Science). After 8h polymerization, 2 μm -thick sections were cut

467 (Ultracut, Reichert-Jung) and stained with toluidine blue 0.1%-methylene blue 0.2% - borax
468 1% solution in water.

469 Ultra-thin sections (70-80 nm) were cut, plated on 200-mesh copper grids and stained with
470 0.5% uranyl acetate in 50% Ethanol. Observations were made with an Hitachi HT7700
471 transmission electron microscope.

472 Live and dead staining of bacteroids

473 3 week-old nodules were harvested, embedded in 5% (w/v) agarose and cut with a Leica
474 VT1200S vibratome. Nodule sections (60 μ m) were incubated for 20 min in Live/Dead
475 staining solution (SYTO9 5.01 μ M, propidium iodide (PI) 29.9 μ M) in Tris/HCl buffer (50
476 mM), pH 7.0 (Live/Dead®BacLight™, Invitrogen). After 3 washes in deionized water,
477 nodule sections were mounted in water and observed with a Zeiss confocal microscope.

478

479 Shoot dry weight

480 Plant shoots were carefully cut and inserted in glass tubes. The dry weight of the shoot of
481 about 30 plants was determined after incubation at 65°C for 72 h.

482

483 NO detection in root nodules

484 Quantification of NO by using the fluorescent DAF-2 probe

485 NO released from nodules was quantified by using the fluorescent non-permeable DAF-2
486 probe (Sigma-Aldrich) as described in (Horchani *et al.*, 2011). 10 plants were inoculated with
487 each bacterial genotype and their nodules were collected and pooled in a multiwell plate
488 containing 1 ml of Tris HCl (10 mM), KCl (10 mM) pH 7.5 with DAF-2 (10 μ M).
489 Fluorescence was measured every 5 min during 3 h using a microplate reader
490 spectrofluorimeter (Fluostar Omega, BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) at 28°C
491 (excitation wavelength, 495 nm/emission wavelength, 515 nm). The slope of the curve was

calculated and expressed as fluorescence units per min per mg of wet nodules. In control experiments, a NO scavenger, cPTIO (2-(4-carboxylphenyl)-4,4,5,5-tetramethyl imidazoline-1-oxyl-3-oxide, Sigma Aldrich) (1 mM) was added on WT elicited nodules, 20 min before the addition of the DAF-2 probe and the fluorescence measured in this condition was considered as NO-non specific. cPTIO enhanced DAF-2 fluorescence even in the absence of NO; hence, the fluorescence measured when only cPTIO and DAF-2 were present in the reaction was deduced from the non specific fluorescence (in presence of WT nodules) (Cam *et al.*, 2012).

Detection of NO by using NO biosensor strains

The NO biosensor consists in a reporter plasmid (psma1289-lacZ) (Table 1) carrying a transcriptional *lacZ* fusion to the *S. meliloti* *Sma1289* gene promoter (del Giudice *et al.*, 2011). Seedlings were inoculated with the different strains containing the NO biosensor. Three weeks post-inoculation, nodule sections (60 µm) obtained by using a Leica VT1200S vibratome were fixed in Z' buffer (0.1 M phosphate buffer pH 7.4; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄) with glutaraldehyde (1.25%) under vacuum for 1.5h. The sections were then washed 3 times 10 minutes with Z' buffer and incubated in the same buffer containing 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide and 0.8% X-gal. Nodule sections were incubated for 1 h under vacuum at room temperature and a further hour at 37 °C. Sections were observed in bright light optical microscopy (Axioplan imagin2 from Zeiss). Pictures were taken with an AxioCam (Zeiss) and processed with the corresponding software.

Protein extraction from plant tissues

Root nodules of *M. truncatula* were homogenized at 4°C with a mortar and pestle in two volumes of extraction buffer (PBS, pH7.4 containing 0.05% Triton X-100 and 1mM PMSF) and the homogenates centrifuged at 13000 g for 20 min, at 4°C.

517

518 **Determination of GS activity**

519 GS activity was determined using the transferase assay (Cullimore & Sims, 1980). One unit of
520 transferase activity is equivalent to 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ γ -glutamyl hydroxamate produced at 30°C.
521 Activity data were expressed as the mean \pm SD of at least three independent experiments, with
522 triplicate technical assays for each experiment.

523

524 **Protein determination, SDS-PAGE and western blot analysis**

525 Soluble protein concentration was measured by the Coomassie dye-binding assay (BioRad)
526 using BSA as a standard. Soluble protein extracts were separated by 12.5% (w/v) SDS-
527 polyacryamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto nitrocellulose
528 membranes (Schleicher & Schuell) using a Criterion Blotter from BioRad.

529 GS immunodetection was carried out using rabbit serum antibody raised against a GS isoform
530 from *Phaseolus vulgaris* (kindly provided by Dr. Julie Cullimore from INRA Toulouse;
531 (Cullimore *et al.*, 1984) and a secondary goat anti-rabbit peroxidase conjugated antibody
532 (Vector Laboratories). The immunocomplexes were detected by chemiluminescence, using the
533 ECL™ (GE Healthcare, Lifesciences) detection system, with a photographic film.
534 Representative blots of at least 3 independent experiments are shown in Fig 5. GS protein
535 quantification was performed using the Molecular imager GS800 calibrated densitometer
536 (Bio-Rad) and Quantity 1-D Analysis software (Bio-Rad).

537

538 **Quantification of nitrated GS by ELISA**

539 A microtiter plate (F8 Maxisorp Nunc-Immuno module, Nunc, Roskilde, Denmark) was
540 coated with the anti-glnA-Antibody (Cullimore *et al.*, 1984) diluted in PBS (50 μL /well), and
541 incubated overnight at 4 °C. After two washings (PBS, pH 7.4, 0.5% Tween 20), the plate was

blocked (PBS, pH 7.4, 3% BSA, 100 μ L/well) for 2 h at room temperature. The blocking buffer was removed, and the plant extracts were diluted in extraction buffer to 10 μ g in 50 μ L and the calibration standard solution was added to the plate (50 μ L/well) and incubated for 4 h at room temperature. All experiments were performed in duplicate. After five washings, a diluted biotin-labeled monoclonal antibody against 3-nitrotyrosine (100 μ L/well, Cayman chemicals) was added to the plate and incubated for 2 h at room temperature. After washing, a NeutrAvidin-HRP-conjugate (Invitrogen) was added to the plate and incubated for 1 h at room temperature.

The plates were washed 4 times with wash buffer before adding 100 μ L/well of *p*-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma Fast™, Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, Mo., U.S.A.). The plates were incubated in the dark for 30 min at room temperature before stopping the reaction by the addition of 100 μ L/well of 0.25 M HCl. The absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (μ Quant Microplat Spec, Biotek). Standard curves were established by serial dilutions (1 to 5 ng) of *in vitro* nitrated GS per well. For this purpose, *E. coli*-produced MtGS1a was purified and pre-incubated with 100 μ M peroxynitrite for 15 minutes at room temperature. Since it is not possible to ensure that GS is nitrated to completion in the *in vitro* nitration assays of the standards used for the quantification, GS nitration values are presented as arbitrary units in relation to the relative amount of cytosolic GS polypeptides quantified by densitometry. The GS nitration values for the mutant nodules were normalized to the wt and are presented as percentage of WT.

Acknowledgements: We thank Anke Becker (University of Bielefeld, Germany) for giving us some *S. meliloti* mutants. We are grateful to Laurent Sauviac and Pierre Dupuy for many helpful discussions and technical support. We gratefully acknowledge Julie Cullimore for providing GS-antibody.

PB is recipient of a Contrat Jeune Scientifique INRA. EM was supported by the National Institute for Applied Sciences (INSA-Toulouse). This work was supported by the French Laboratory of Excellence project “TULIP” (ANR-10-LABX-41 and ANR-11-IDEX-0002-02), by community funds (FEDER) through the Operational Competitiveness Program COMPETE and by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) under the project FCOMP-01-0124-FEDER-028335 (PTDC/BIA-PLA/2291/2012).

586

587

588 **References**

- 589 Abello N., Kerstjens H.A., Postma D.S. and Bischoff R. 2009. Protein tyrosine nitration:
590 selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics
591 methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *J. Proteome Res.* 8: 3222-3238.
- 592 Arai H., Roh J.H., Eraso J.M. and Kaplan S. 2013. Transcriptome response to nitrosative
593 stress in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 111-118.
- 594 Astier J. and Lindermayr C. 2012. Nitric oxide-dependent posttranslational modification in
595 plants: an update. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 15193-15208.
- 596 Bartnikas T.B., Wang Y., Bobo T., Veselov A., Scholes C.P. and Shapleigh J.P. 2002.
597 Characterization of a member of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3
598 encoding a haem-copper protein. *Microbiology.* 148: 825-833.
- 599 Baudouin E., Pieuchot L., Engler G., Pauly N. and Puppo A. 2006. Nitric oxide is formed in
600 *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
601 19: 970-975.
- 602 Begara-Morales J.C., Chaki M., Sánchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Leterrier M., Palma J.M.,
603 Barroso J.B. and Corpas F.J. 2013. Protein tyrosine nitration in pea roots during development
604 and senescence. *J. Exp. Bot.* 64(4):1121-1134.
- 605 Besson-Bard A., Pugin A. and Wendehenne D. 2008. New insights into nitric oxide signaling
606 in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 21-39.
- 607 Bowman L.A., McLean S., Poole R.K. and Fukuto J.M. 2011. The diversity of microbial
608 responses to nitric oxide and agents of nitrosative stress close cousins but not identical twins.
609 *Adv. Microb. Physiol.* 59: 135-219.

610 Cam Y., Pierre O., Boncompagni E., Herouart D., Meilhoc E. and Bruand C. 2012. Nitric
611 oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. New Phytol.
612 196: 548-560.

613 Capela D., Filipe C., Bobik C., Batut J., Bruand C. 2006. *Sinorhizobium meliloti*
614 differentiation during symbiosis with alfalfa: a transcriptomic dissection. Mol. Plant-Microbe
615 Interact. 19(4):363-72.

616 Carvalho H., Lescure N., de Billy F., Chabaud M., Lima L., Salema R. and Cullimore J.
617 2000a. Cellular expression and regulation of the *Medicago truncatula* cytosolic glutamine
618 synthetase genes in root nodules. Plant Mol. Biol. 42: 741-756.

619 Carvalho H., Lima L., Lescure N., Camut S., Salema R. and Cullimore J. 2000b. Differential
620 expression of the two cytosolic glutamine synthetase genes in various organs of *Medicago*
621 *truncatula*. Plant Sci. 159: 301-312.

622 Cullimore J.V., Gebhardt C., Saarelainen R., Mifflin B.J., Idler K.B. and Barker R.F. 1984.
623 Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene
624 family. J. Mol. Appl. Genet. 2: 589-599.

625 Cullimore J.V. and Sims A.P. 1980. An association between photorespiration and protein
626 catabolism: Studies with *Chlamydomonas*. Planta. 150: 392-396.

627 de Bruijn F.J., Rossbach S., Bruand C. and Parrish J.R. 2006. A highly conserved
628 *Sinorhizobium meliloti* operon is induced microaerobically via the FixLJ system and by nitric
629 oxide (NO) via NnrR. Environ. Microbiol. 8: 1371-1381.

630 del Giudice J., Cam Y., Damiani I., Fung-Chat F., Meilhoc E., Bruand C., Brouquisse R.,
631 Puppo A. and Boscari A. 2011. Nitric oxide is required for an optimal establishment of the
632 *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. New Phytol. 191: 405-417.

Figurski D.H. and Helinski D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 76: 1648-1652.

Filippou P., Antoniou C., Yelamanchili S., Fotopoulos V. 2012. NO loading: Efficiency assessment of five commonly used application methods of sodium nitroprusside in *Medicago truncatula* plants. *Plant Physiol. Biochem.* 60:115-8.

Gupta K.J., Hebelstrup K.H., Mur L.A. and Igamberdiev A.U. 2011. Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide. *FEBS Lett*, 585: 3843-3849.

Horchani F., Prevot M., Boscari A., Evangelisti E., Meilhoc E., Bruand C., Raymond P., Boncompagni E., Aschi-Smiti S., Puppo A. and Brouquisse R. 2011. Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules. *Plant Physiol.* 155: 1023-1036.

Jamet A., Euphrasie D., Martin P. and Nassif X. 2013. Identification of genes involved in *Neisseria meningitidis* colonization. *Infect. Immun.* 81: 3375-3381.

Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E. and Walker G.C. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619-633.

Justino M.C., Almeida C.C., Teixeira M. and Saraiva L.M. 2007. *Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters. *J. Biol. Chem.* 282: 10352-10359.

Justino M.C., Baptista J.M. and Saraiva L.M. 2009. Di-iron proteins of the Ric family are involved in iron-sulfur cluster repair. *Biometals.* 22: 99-108.

Kato K., Kanahama K. and Kanayama Y. 2010. Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in Lotus root nodules. *J. Plant Physiol.* 167: 238-241.

658 Lullien V., Barker D.G., de Lajudie P. and Huguet T. 1987. Plant gene expression in effective
 659 and ineffective root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*). Plant Mol. Biol. 9: 469-478.
 660 Mathieu C., Moreau S., Frendo P., Puppo A. and Davies M.J. 1998. Direct detection of
 661 radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. Free
 662 Radic Biol Med. 24: 1242-1249.
 663 Meilhoc E., Blanquet P., Cam Y. and Bruand C. 2013. Control of NO level in rhizobium-
 664 legume root nodules: not only a plant globin story. Plant Signal. Behav. 8: doi: 10.4161/psb
 665 25923.
 666 Meilhoc E., Boscari A., Bruand C., Puppo A. and Brouquisse R. 2011. Nitric oxide in
 667 legume-rhizobium symbiosis. Plant Sci. 181: 573-581.
 668 Meilhoc E., Cam Y., Skapski A. and Bruand C. 2010. The response to nitric oxide of the
 669 nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Mol. Plant-Microbe Interact. 23: 748-759.
 670 Melo P.M., Silva L.S., Ribeiro I., Seabra A.R. and Carvalho H.G. 2011. Glutamine synthetase
 671 is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated
 672 by tyrosine nitration. Plant Physiol. 157: 1505-1517.
 673 Mur L.A., Carver T.L and Prats E. 2006. NO way to live; the various roles of nitric oxide in
 674 plant-pathogen interactions. J. Exp. Bot. 57: 489-505.
 675 Mur L.A., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A.,
 676 Harren F.J., Hebelstrup K.H. and Gupta K.J. 2012. Nitric oxide in plants: an assessment of the
 677 current state of knowledge. AoB Plants. 5: pls052.
 678 Nagata M., Murakami E., Shimoda Y., Shimoda-Sasakura F., Kucho K., Suzuki A., Abe M.,
 679 Higashi S. and Uchiumi T. 2008. Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of
 680 nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*. Mol Plant-
 681 Microbe Interact. 21: 1175-1183.

682 Navascues J., Perez-Rontome C., Gay M., Marcos M., Yang F., Walker F.A., Desbois A.,
 683 Abian J. and Becana M. 2011. Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence
 684 production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules. Proc. Natl.
 685 Acad. Sci. U S A. 109: 2660-2665.

686 Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S. and Downie J.A. 2011. The rules of engagement in the
 687 legume-rhizobial symbiosis. Annu. Rev. Genet. 45: 119-144.

688 Pei J., Li W., Kinch L.N. and Grishin N.V. 2014. Conserved evolutionary units in the heme-
 689 copper oxidase superfamily revealed by novel homologous protein families. Protein Sci.
 690 23(9):1220-34

691 Pii Y., Crimi M., Cremonese G., Spena A. and Pandolfini T. 2007. Auxin and nitric oxide
 692 control indeterminate nodule formation. BMC Plant Biol. 7: 21.

693 Pobigaylo N., Szymczak S., Nattkemper T.W. and Becker A. 2008. Identification of genes
 694 relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged
 695 mutants. Mol. Plant-Microbe Interact. 21: 219-231.

696 Procházková D. and Wilhelmová N. 2011. Nitric oxide, reactive nitrogen species and
 697 associated enzymes during plant senescence. Nitric Oxide. 24(2):61-5.

698 Puppo A., Groten K., Bastian F., Carzaniga R., Soussi M., Lucas M.M., de Felipe M.R.,
 699 Harrison J., Vanacker H. and Foyer C.H. 2005. Legume nodule senescence: roles for redox
 700 and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. New Phytol. 165:
 701 683-701.

702 Puppo A., Pauly N., Boscari A., Mandon K. and Brouquisse R. 2013. Hydrogen peroxide and
 703 nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. Antioxid.
 704 Redox Signal. 18: 2202-2219.

705 Roux B., Rodde N., Jardinaud M.F., Timmers T., Sauviac L., Cottret J.L, Carrère S., Sallet E.,
 706 Courcelle E., Moreau S., Debellé F., Capela D., de Carvalho-Niebel F., Gouzy J., Bruand C.,

707 and Gamas P. 2014. An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in
 708 symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing. *Plant*
 709 *J.* 77(6):817-837.

710 Sainz M., Calvo-Begueria L., Pérez-Rontomé C., Wienkoop S., Abián J., Staudinger C.,
 711 Bartesaghi S., Radi R. and Becana M. 2015. Leghemoglobin is nitrated in functional legume
 712 nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/ peroxide-dependent
 713 mechanism. *Plant J.* 81, 723–735.

714 Sanchez C. Gates A.J., Meakin G.E., Uchiumi T., Girard L., Richardson D.J., Bedmar E.J.
 715 and Delgado M.J. 2010. Production of nitric oxide and nitrosylleghemoglobin complexes in
 716 soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23: 702-711.

717 Sauviac L., Philippe H., Phok K. and Bruand C. 2007. An extracytoplasmic function sigma
 718 factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 2007
 719 189(11):4204-16.

720 Sousa F.L., Alves R.J., Ribeiro M.A., Pereira-Leal J.B., Teixeira M. and Pereira M.M. 2012.
 721 The superfamily of heme-copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations.
 722 *Biochim. Biophys. Acta.* 1817: 629-637.

723 Stern A.M., Hay A.J., Liu Z., Desland F.A., Zhang J., Zhong Z. and Zhu J. 2012. The NorR
 724 regulon is critical for *Vibrio cholerae* resistance to nitric oxide and sustained colonization of
 725 the intestines. *MBio.* 3: e00013-00012.

726 Stern A.M., Liu B., Bakken L.R., Shapleigh J.P. and Zhu J. 2013. A novel protein protects
 727 bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide. *J. Bacteriol.* 195: 4702-4708.

728 Stern A.M. and Zhu J. 2014. An introduction to nitric oxide sensing and response in bacteria.
 729 *Adv. Appl. Microbiol.* 87: 187-220.

730 Terpolilli J.J., Hood G.A. and Poole P.S. 2012. What determines the efficiency of N(2)-fixing
 731 *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.* 60: 325-389.

732 Timmers A.C., Soupene E., Auriac M.C., de Billy F., Vasse J., Boistard P. and Truchet G.
733 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:
734 1204-1213.

735 Trinchant J.C. and Rigaud J. 1982. Nitrite and Nitric Oxide as Inhibitors of Nitrogenase from
736 Soybean Bacteroids. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1385-1388.

737 Wang Y. and Ruby E.G. 2011. The roles of NO in microbial symbioses. *Cell Microbiol.* 13:
738 518-526.

739 Yu M., Lamattina L., Spoel S.H. and Loake G.J. 2014. Nitric oxide function in plant biology:
740 a redox cue in deconvolution. *New Phytol.* 202: 1142-1156.

741

742

743

744

745

746

747

748

749

750

751

752

753

754

755

756

Table 1 : Strains and plasmids

| Strain or plasmid | Description | Reference or source |
|---------------------------------|--|------------------------------------|
| <i>Sinorhizobium meliloti</i> | | |
| GMI11495 | Sm ^r derivative of Rm2011 | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT619 | GMI11495 <i>nnrS1::Tn5</i> , Sm ^r , Nm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT1418 | GMI11495 Δ <i>nnrS2</i> , Sm ^r | This work |
| CBT613 | GMI11495 <i>hmp::Tn5</i> , Sm ^r , Nm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT618 | GMI11495 <i>norB::Tn5</i> , Sm ^r , Nm ^r | (Pobigaylo <i>et al.</i> , 2006) |
| CBT602 | GMI11495 containing pBBR-hmp, Sm ^r , Gm ^r | (Meilhoc <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| DH5 α | <i>supE44 lacU169 hsdR17 recA1 endA gyrA96 thi-1 relA1</i> | Invitrogen |
| <i>Plasmids</i> | | |
| pGEM-T | Cloning vector, Amp ^r | Promega |
| pGEM 3'UTR | 3'UTR <i>nnrS2</i> ligated with pGEM-T, Amp ^r | This work |
| pGEM 5'UTR | 5'UTR <i>nnrS2</i> ligated with pGEM-T, Amp ^r | This work |
| pBBR-hmp | pBBRMCS-5 + hmp, Gm ^r | (Meilhoc <i>et al.</i> , 2010) |
| pJQ200mp19 | Gene replacement vector, Gm ^r | (Sauviac <i>et al.</i> , 2007) |
| pJQ200mp19 3'5'UTR <i>nnrS2</i> | 3' 5'UTRs <i>nnrS2</i> ligated with pJQ200, Gm ^r | This work |
| psma1289-lacZ | Plasmid expressing a <i>sma1289-lacZ</i> reporter fusion, Tet ^r | (del Guidice <i>et al.</i> , 2011) |
| pRK2013 | Helper plasmid for triparental matings, Km ^r | (Figurski and Helinski, 1979) |

Figure Legends:

Figure 1: Nodule senescence kinetics of *M. truncatula* inoculated with *S. meliloti* mutant strains.

M. truncatula plantlets were inoculated with *S. meliloti* GMI11495 (WT), CBT619 (*nnrS1*), CBT1418 (*nnrS2*), CBT613 (*hmp*) or CBT618 (*norB*) mutant. At each time point, total and senescent nodules were counted for each of 3 independent series of ten plants; hence the percentage of senescent nodules was determined for each series. The mean +/- standard error is shown on the graph. The kinetics of nodule appearance was similar for the different strains (not shown). At time point 17 dpi where the first senescent nodules appear, the total number of nodules counted in a series was 70-110.

Figure 2: Shoot dry weight of *M. truncatula* inoculated with *nnrS* mutant strains

M. truncatula plantlets were inoculated with *S. meliloti* GMI11495 (WT), CBT619 (*nnrS1*), CBT1418 (*nnrS2*), CBT613 (*hmp*) or CBT618 (*norB*) mutant. The shoot dry weight of about 30 plants was measured between 38 and 40 days post inoculation. The mean +/- standard error is shown on the graph. * and ** indicate significant difference ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively) when compared with the control (WT strain) according to student's t-test.

Figure 3: Microscopic characterization of *M. truncatula* nodules elicited by *nnrS* mutant strains

M. truncatula plantlets were inoculated with *S. meliloti* GMI11495 (WT) (a), CBT619 (*nnrS1*) (b) or CBT1418 (*nnrS2*) (c) mutant. Nodule senescence was observed by means of toluidine blue-staining on longitudinal thin (2µm) nodule sections. The nodule senescence zone is indicated by a bracket.

Ultrastructural changes were observed by means of Transmission Electron Microscopy on ultrathin (70-80nm) sections of 20 day-old nodules occupied by the *S. meliloti* CBT619 (*nnrS1*) mutant. d, e) cells from the infection zone (zone II) displaying infection threads releasing bacteria in the plant cells (indicated by the white arrows), f) cells from the fixation zone (zone III) with differentiated bacteroids, g, h) cells from the senescent zone (senescent plant cells indicated with an asterisk), i) reinvasion of senescent cells by undifferentiated saprophytic bacteria.

Figure 4: NO production by *M. truncatula* nodules

Plantlets were inoculated with *S. meliloti* GMI11495 (WT), CBT619 (*nnrS1*), CBT1418 (*nnrS2*), CBT613 (*hmp*) or CBT618 (*norB*) mutant. NO production by nodules was measured at 14, 18 and 26 dpi using the non permeable fluorescent probe diaminofluorescein-2 (DAF-2). In a control experiment, 1mM cPTIO was added 30 minutes before addition of the probe to WT nodules. Fluorescence was expressed as a percentage of the fluorescence obtained with WT nodules at the same time point. Data are means +/- standard errors of 3 independent experiments (assayed in duplicate). The dotted line indicates the value of the WT.

Figure 5. Evaluation of GS nitration in nodules formed by *S. meliloti* *hmp*, *hmp*⁺⁺ or *nnrS* strains.

M. truncatula plantlets were inoculated with *S. meliloti* GMI11495 (WT), CBT613 (*hmp*), CBT602 (*hmp*⁺⁺), CBT619 (*nnrS1*) or CBT1418 (*nnrS2*) strain. Total soluble proteins were extracted from nodules collected at 3 weeks post-inoculation (wpi). GS activity was measured by the transferase reaction (a,d). The cytosolic GS (GS1) immunoreactive bands were quantified by densitometry and the values were plotted (b,e). A representative GS western blot of total soluble proteins (10 µg per lane) is shown (b,e). GS nitration was quantified by sandwich ELISA relative to GS1 polypeptide content. GS nitration in the mutant nodules was normalized to that found in WT nodules (c,f). Mean values were obtained from three

809 biological replicates \pm SD, assayed in duplicate. * and ** indicate significant difference
810 ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively) when compared with the control (WT strain) according to
811 student's t-test.

812

813

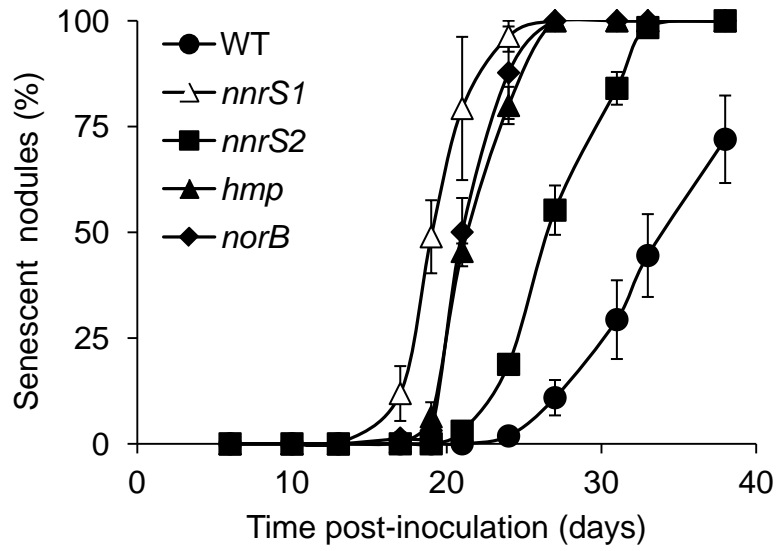


Figure 1

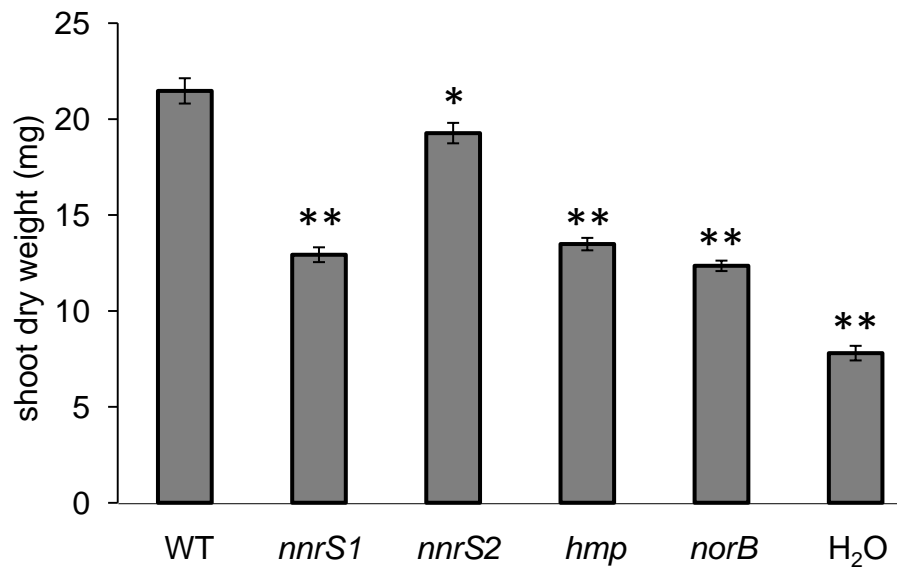


Figure 2

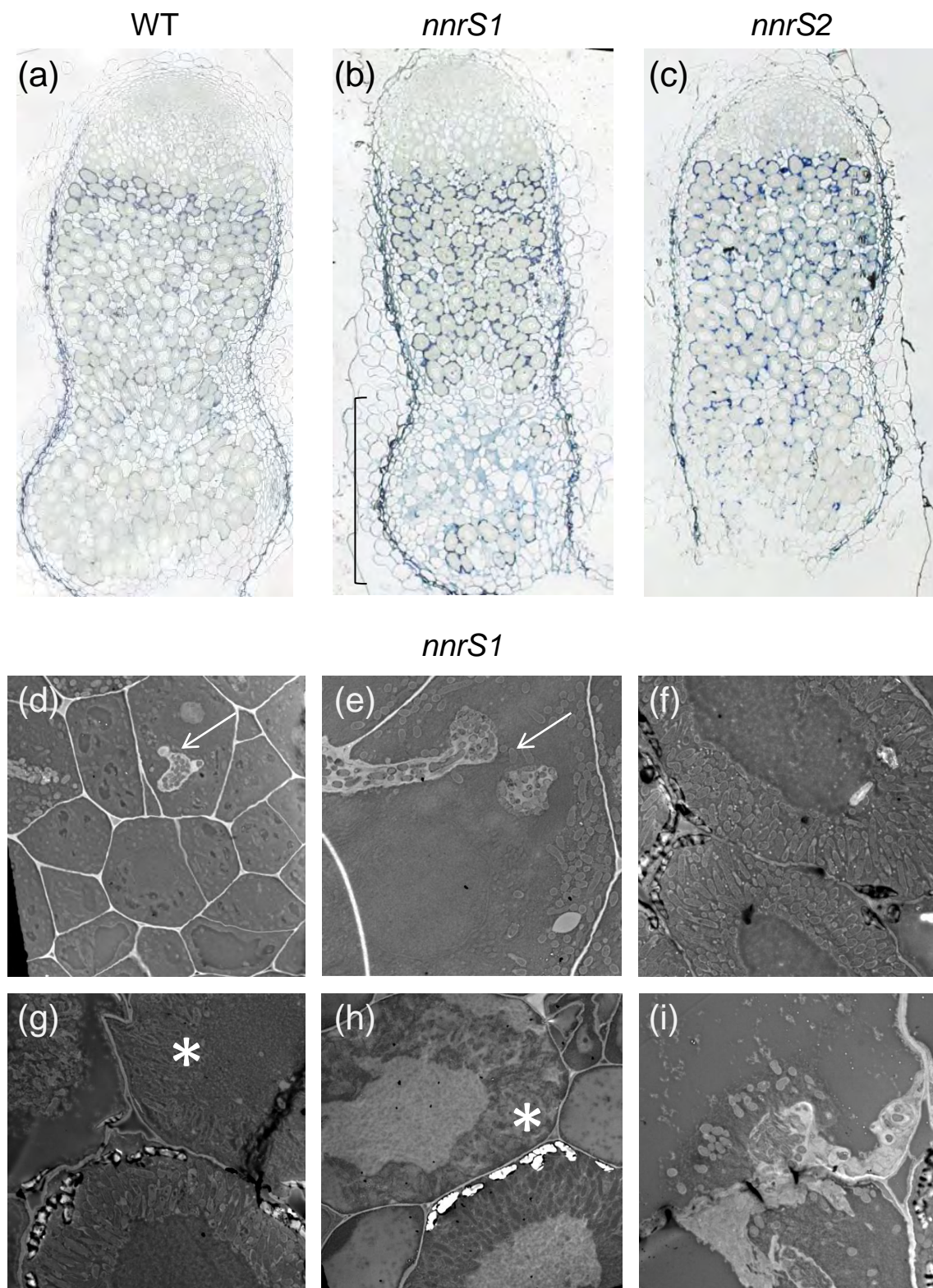


Figure 3

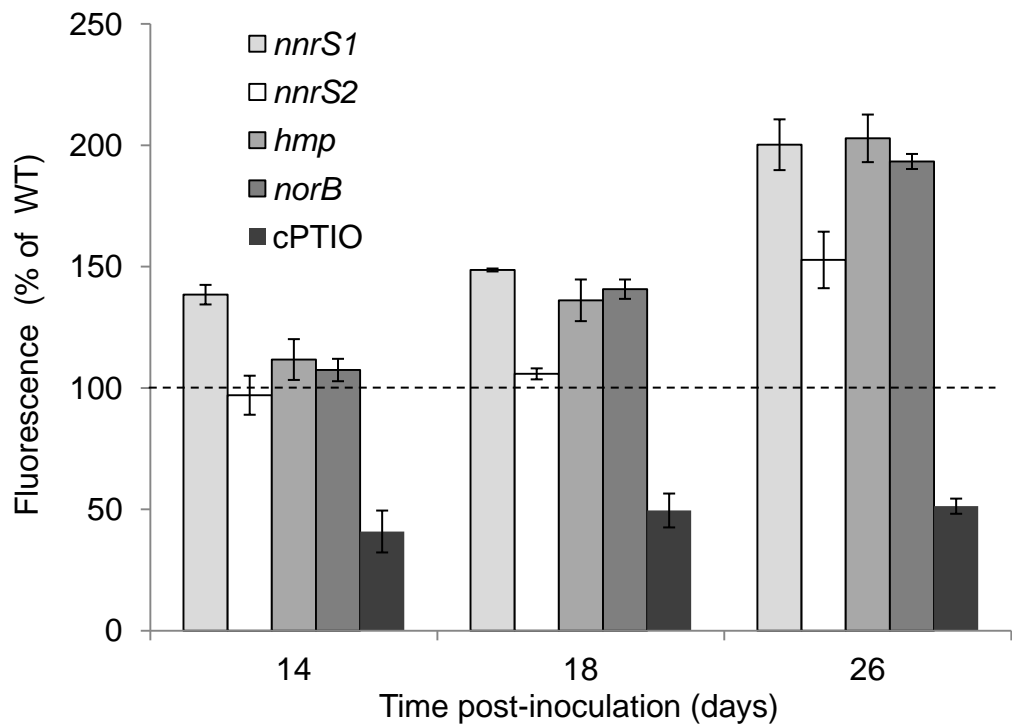


Figure 4

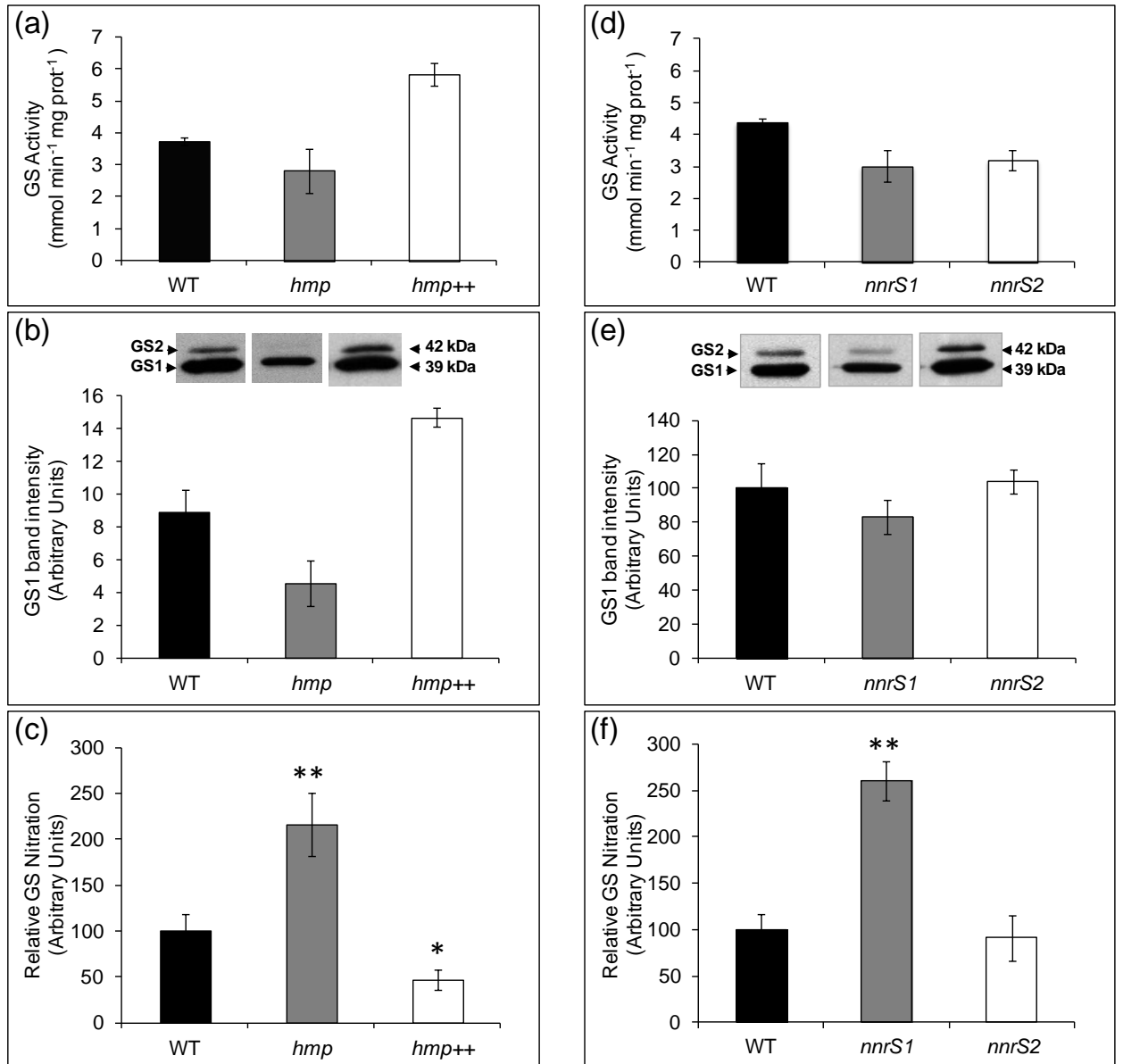


Figure 5

Supplementary data

Figure S1: Microscopic characterization of *M. truncatula* nodules elicited by *norB* and *hmp* mutant strains

M. truncatula plantlets were inoculated with *S. meliloti* *hmp* CBT613 (*hmp*) or CBT618 (*norB*) mutant. Ultrastructural changes were observed by means of Transmission Electron Microscopy on ultrathin (70-80nm) sections of 20 day-old nodules occupied by the *S. meliloti* mutants. a) cells from the infection zone (zone II) displaying infection threads releasing bacteria in the plant cells, b) cells from the fixation zone (zone III) with differentiated bacteroids, c) cells from the senescent zone.

Figure S2: Live and dead staining of WT and mutant bacteroids.

M. truncatula plantlets were inoculated with either the *S. meliloti* GMI11495 (WT), CBT613 (*hmp*), CBT618 (*norB*), CBT619 (*nnrS1*) or CBT1418 (*nnrS2*) mutant. At 19 dpi, nodule sections (60 μ m) were stained with a mixture of SYTO9 and PI to test the viability of bacteroids. Viable cells are stained in green by SYTO9 and dying cells are stained in red with PI. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Scale bars=100 μ m

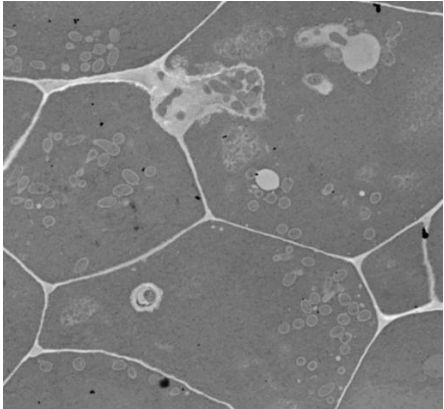
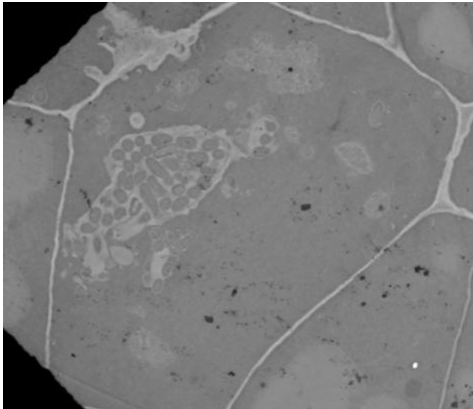
Figure S3: Nitric oxide detection in *M. truncatula* nodules using NO biosensor *S. meliloti* WT and *nnrS* strains.

M. truncatula were inoculated with the *S. meliloti* GMI11495 (WT), CBT619 (*nnrS1*), or CBT1418 (*nnrS2*) strain harbouring the SMA1289-lacZ fusion. Nodules were collected at 19 and 26 dpi and sections (60 μ M) were stained for β -gal activity. Observations were made with an optical microscope on 6 nodules from 3 plants from at least 3 independent experiments. Representative images are shown.

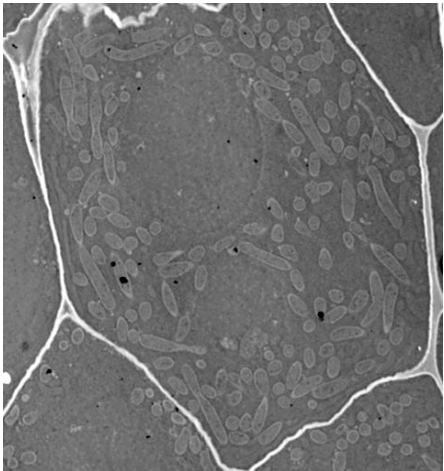
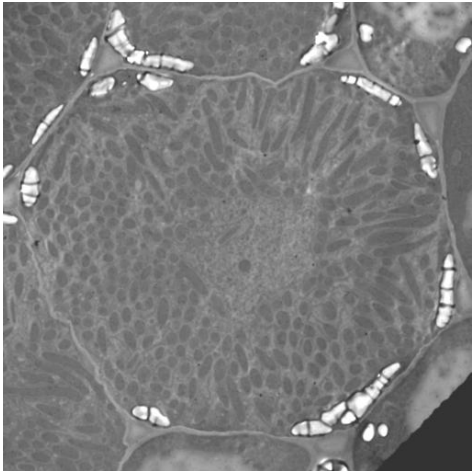
hmp

norB

(a)



(b)



(c)

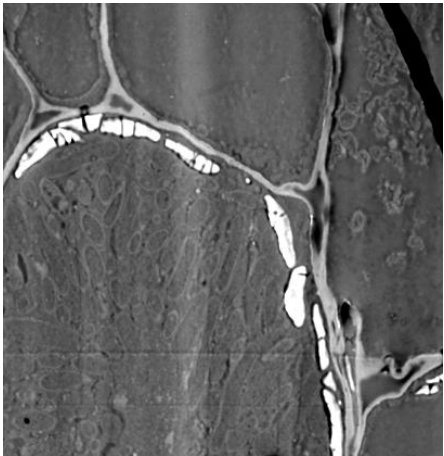
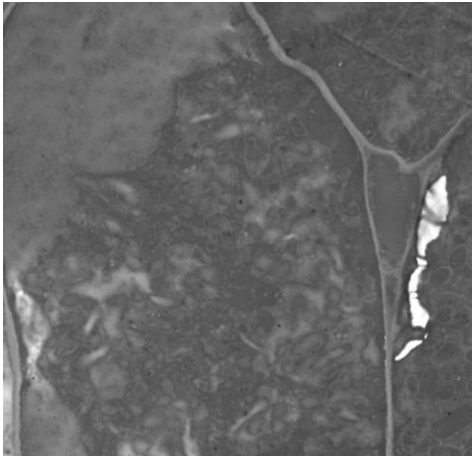


Figure S1

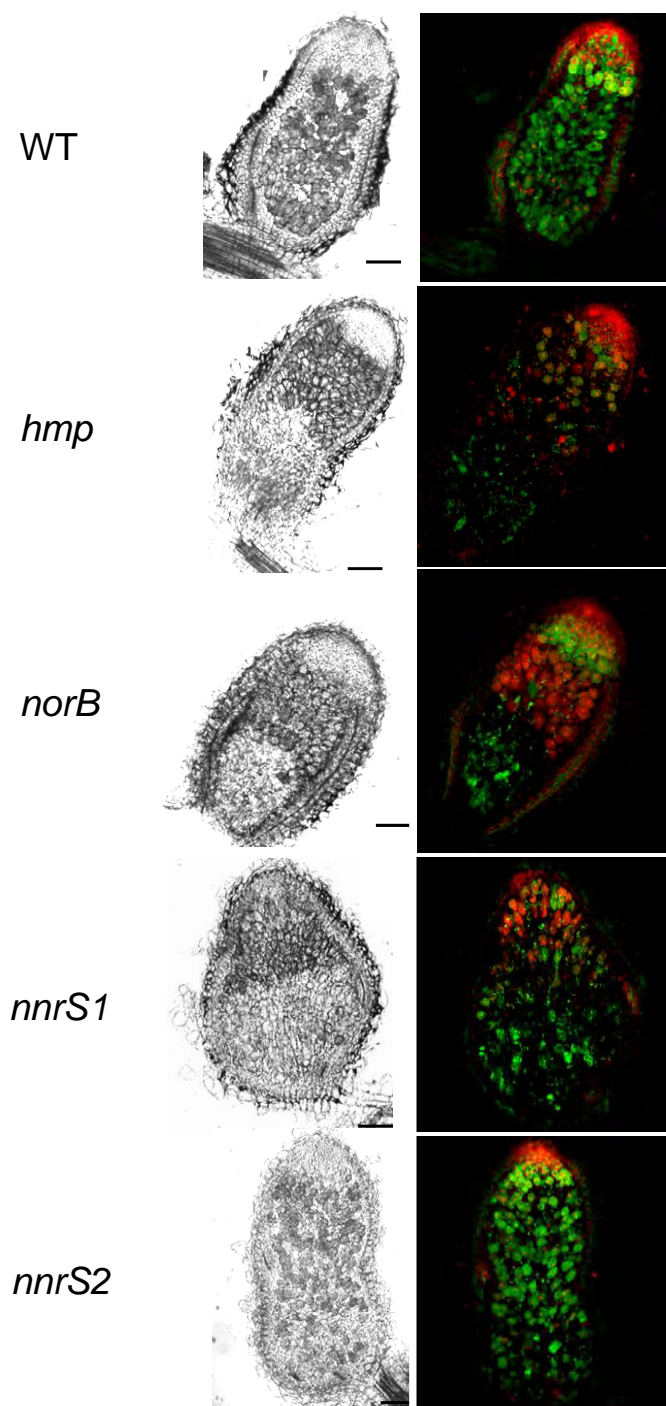


Figure S2

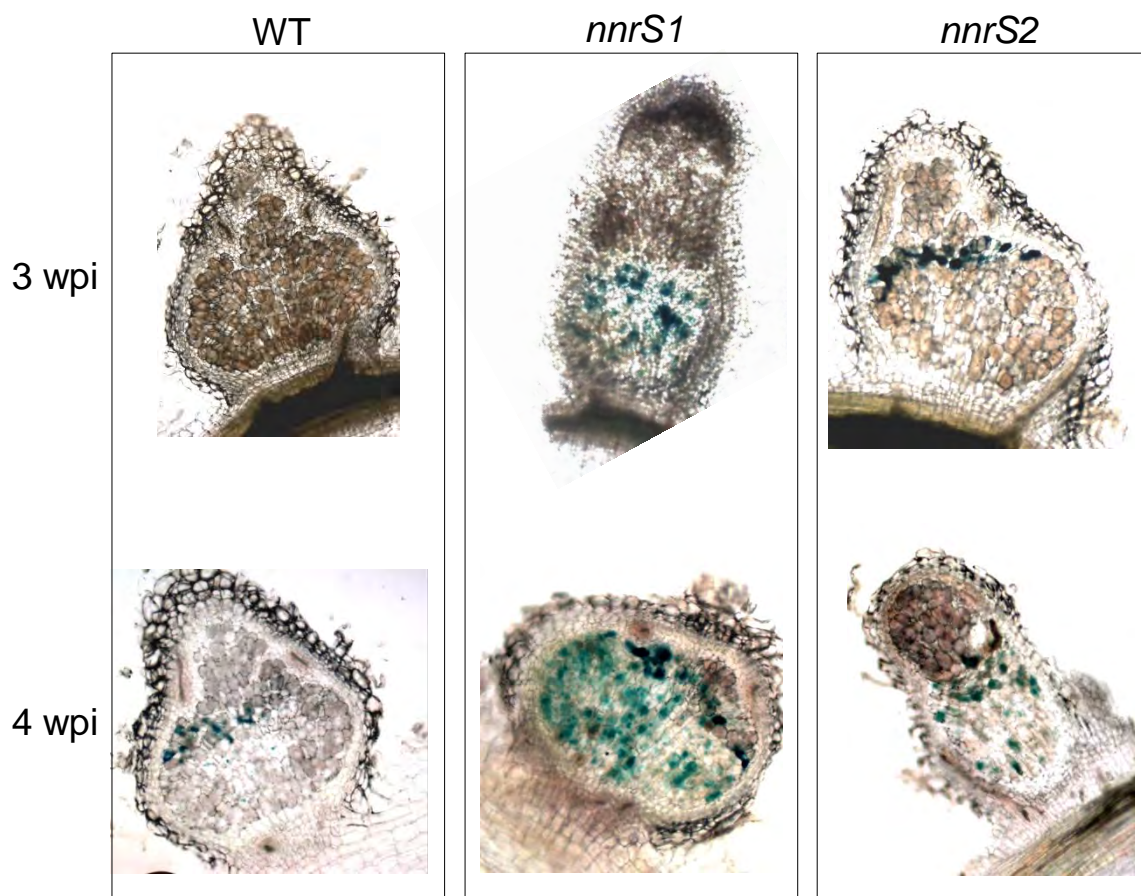


Figure S3

REFERENCES

- Abello, N., Kerstjens, H. A., Postma, D. S. and Bischoff, R. (2009) 'Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins', *J Proteome Res*, 8(7), pp. 3222-38.
- Agurla, S., Gayatri, G. and Raghavendra, A. S. (2014) 'Nitric oxide as a secondary messenger during stomatal closure as a part of plant immunity response against pathogens', *Nitric Oxide*, 43, pp. 89-96.
- Alvarez, C., Lozano-Juste, J., Romero, L. C., García, I., Gotor, C. and León, J. (2011) 'Inhibition of *Arabidopsis* O-acetylserine(thiol)lyase A1 by tyrosine nitration', *J Biol Chem*, 286(1), pp. 578-86.
- Arc, E., Galland, M., Godin, B., Cuffe, G. and Rajjou, L. (2013) 'Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination', *Front Plant Sci*, 4, pp. 346.
- Astier, J., Kulik, A., Koen, E., Besson-Bard, A., Bourque, S., Jeandroz, S., Lamotte, O. and Wendehenne, D. (2012) 'Protein S-nitrosylation: what's going on in plants?', *Free Radic Biol Med*, 53(5), pp. 1101-10.
- Astier, J. and Lindermayr, C. (2012) 'Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update', *Int J Mol Sci*, 13(11), pp. 15193-208.
- Baptista, J. M., Justino, M. C., Melo, A. M., Teixeira, M. and Saraiva, L. M. (2012) 'Oxidative stress modulates the nitric oxide defense promoted by *Escherichia coli* flavorubredoxin', *J Bacteriol*, 194(14), pp. 3611-7.
- Barloy-Hubler, F., Capela, D., Batut, J. and Galibert, F. (2000) 'High-resolution physical map of the pSymb megaplasmid and comparison of the three replicons of *Sinorhizobium meliloti* strain 1021', *Curr Microbiol*, 41(2), pp. 109-13.
- Barraud, N., Hassett, D. J., Hwang, S. H., Rice, S. A., Kjelleberg, S. and Webb, J. S. (2006) 'Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*', *J Bacteriol*, 188(21), pp. 7344-53.
- Bartnikas, T. B., Wang, Y., Bobo, T., Veselov, A., Scholes, C. P. and Shapleigh, J. P. (2002) 'Characterization of a member of the NnrR regulon in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3 encoding a haem-copper protein', *Microbiology*, 148(Pt 3), pp. 825-33.
- Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly, N. and Puppo, A. (2006) 'Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules', *Mol Plant Microbe Interact*, 19(9), pp. 970-5.
- Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Sánchez-Calvo, B., Mata-Pérez, C., Leterrier, M., Palma, J. M., Barroso, J. B. and Corpas, F. J. (2013) 'Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence', *J Exp Bot*, 64(4), pp. 1121-34.
- Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M. N., Carreras, A., Corpas, F. J. and Barroso, J. B. (2014) 'Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation', *J Exp Bot*, 65(2), pp. 527-38.
- Benhar, M., Forrester, M. T., Hess, D. T. and Stamler, J. S. (2008) 'Regulated protein denitrosylation by cytosolic and mitochondrial thioredoxins', *Science*, 320(5879), pp. 1050-4.
- Benhar, M., Forrester, M. T. and Stamler, J. S. (2009) 'Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(10), pp. 721-32.
- Besson-Bard, A., Courtois, C., Gauthier, A., Dahan, J., Dobrowolska, G., Jeandroz, S., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008a) 'Nitric oxide in plants: production and cross-talk with Ca²⁺ signaling', *Mol Plant*, 1(2), pp. 218-28.
- Besson-Bard, A., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2008b) 'New insights into nitric oxide signaling in plants', *Annu Rev Plant Biol*, 59, pp. 21-39.
- Bethke, P. C., Badger, M. R. and Jones, R. L. (2004) 'Apoplasmic synthesis of nitric oxide by plant tissues', *Plant Cell*, 16(2), pp. 332-41.

- Bethke, P. C., Libourel, I. G., Aoyama, N., Chung, Y. Y., Still, D. W. and Jones, R. L. (2007) 'The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy', *Plant Physiol*, 143(3), pp. 1173-88.
- Blume, Y. B., Krasylenko, Y. A., Demchuk, O. M. and Yemets, A. I. (2013) 'Tubulin tyrosine nitration regulates microtubule organization in plant cells', *Front Plant Sci*, 4, pp. 530.
- Bobik, C., Meilhoc, E. and Batut, J. (2006) 'FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*', *J Bacteriol*, 188(13), pp. 4890-902.
- Boccara, M., Mills, C. E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R. K. and Delledonne, M. (2005) 'Flavo-haemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host', *Plant J*, 43(2), pp. 226-37.
- Bonamore, A. and Boffi, A. (2008) 'Flavo-hemoglobin: structure and reactivity', *IUBMB Life*, 60(1), pp. 19-28.
- Boscari, A., Meilhoc, E., Castella, C., Bruand, C., Puppo, A. and Brouquisse, R. (2013) 'Which role for nitric oxide in symbiotic N₂-fixing nodules: toxic by-product or useful signaling/metabolic intermediate?', *Front Plant Sci*, 4, pp. 384.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J. T., Weir, I. S. and Neill, S. J. (2006) 'ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis', *Plant J*, 45(1), pp. 113-22.
- Cabrera, J. J., Sánchez, C., Gates, A. J., Bedmar, E. J., Mesa, S., Richardson, D. J. and Delgado, M. J. (2011) 'The nitric oxide response in plant-associated endosymbiotic bacteria', *Biochem Soc Trans*, 39(6), pp. 1880-5.
- Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, D., Meilhoc, E. and Bruand, C. (2012) 'Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules', *New Phytol*, 196(2), pp. 548-60.
- Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Rezé, N., Lesch, M., Kaiser, W. M., Dutilleul, C., Guillas, I., Zachowski, A. and Baudouin, E. (2011) 'Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*', *New Phytol*, 189(2), pp. 415-27.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Pühler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thébault, P., Vandenbol, M., Weidner, S. and Galibert, F. (2001) 'Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17), pp. 9877-82.
- Catalá, M., Gasulla, F., Pradas del Real, A. E., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J. and Barreno, E. (2010) 'Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis', *BMC Microbiol*, 10, pp. 297.
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, E., Rinalducci, S., Zolla, L. and Delledonne, M. (2009) 'Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*', *Electrophoresis*, 30(14), pp. 2460-8.
- Chaki, M., Carreras, A., López-Jaramillo, J., Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Valderrama, R., Corpas, F. J. and Barroso, J. B. (2013) 'Tyrosine nitration provokes inhibition of sunflower carbonic anhydrase (β-CA) activity under high temperature stress', *Nitric Oxide*, 29, pp. 30-3.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M. V., López-Jaramillo, J., Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Luque, F., Leterrier, M., Corpas, F. J. and Barroso, J. B. (2011) 'High temperature triggers the metabolism of S-nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin-NADP reductase by tyrosine nitration', *Plant Cell Environ*, 34(11), pp. 1803-18.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A. M., Carreras, A., López-Jaramillo, J., Luque, F., Palma, J. M., Pedrajas, J. R., Begara-Morales, J. C., Sánchez-Calvo, B., Gómez-Rodríguez, M. V., Corpas, F. J. and Barroso, J. B. (2009) 'Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls', *J Exp Bot*, 60(15), pp. 4221-34.
- Clementi, E. (1998) 'Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis', *Biochem Pharmacol*, 55(6), pp. 713-8.

- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Valderrama, R., Palma, J. M., León, A. M., Sandalio, L. M. and del Río, L. A. (2006) 'Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development', *Planta*, 224(2), pp. 246-54.
- Cramm, R., Pohlmann, A. and Friedrich, B. (1999) 'Purification and characterization of the single-component nitric oxide reductase from *Ralstonia eutropha* H16', *FEBS Lett*, 460(1), pp. 6-10.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S. and Golvano, M. P. (1996) 'Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*', *FEBS Lett*, 398(2-3), pp. 159-64.
- Cullimore, J. V., Gebhardt, C., Saarelainen, R., Mifflin, B. J., Idler, K. B. and Barker, R. F. (1984) 'Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family', *J Mol Appl Genet*, 2(6), pp. 589-99.
- Cullimore, J. V. and Sims, A. P. (1980) 'An association between photorespiration and protein catabolism: Studies with *Chlamydomonas*', *Planta*, 150(5), pp. 392-6.
- David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., Hertig, C., Boistard, P. and Kahn, D. (1988) 'Cascade regulation of nif gene expression in *Rhizobium meliloti*', *Cell*, 54(5), pp. 671-83.
- Deeb, R. S., Nuriel, T., Cheung, C., Summers, B., Lamon, B. D., Gross, S. S. and Hajjar, D. P. (2013) 'Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 305(5), pp. H687-98.
- del Giudice, J., Cam, Y., Damiani, I., Fung-Chat, F., Meilhoc, E., Bruand, C., Brouquisse, R., Puppo, A. and Boscari, A. (2011) 'Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis', *New Phytol*, 191(2), pp. 405-17.
- Domingos, P., Prado, A. M., Wong, A., Gehring, C. and Feijo, J. A. (2015) 'Nitric oxide: a multitasked signaling gas in plants', *Mol Plant*, 8(4), pp. 506-20.
- Dunn, A. K., Karr, E. A., Wang, Y., Batton, A. R., Ruby, E. G. and Stabb, E. V. (2010) 'The alternative oxidase (AOX) gene in *Vibrio fischeri* is controlled by NsrR and upregulated in response to nitric oxide', *Mol Microbiol*, 77(1), pp. 44-55.
- Dupont, L., Alloing, G., Pierre, O., El Msehli, S., Hopkins, J., Hérouard, D., Frendo, P. (2012) 'The legume root nodule: from symbiotic nitrogen to senescence', InTechOpen
- Díaz-Moreno, I., García-Heredia, J. M., Díaz-Quintana, A., Teixeira, M. and De la Rosa, M. A. (2011) 'Nitration of tyrosines 46 and 48 induces the specific degradation of cytochrome c upon change of the heme iron state to high-spin', *Biochim Biophys Acta*, 1807(12), pp. 1616-23.
- Fahey, R. C. (2013) 'Glutathione analogs in prokaryotes', *Biochim Biophys Acta*, 1830(5), pp. 3182-98.
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A. and Delledonne, M. (2008) 'Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions', *Mol Plant Microbe Interact*, 21(6), pp. 781-90.
- Figurski, D. H. and Helinski, D. R. (1979) 'Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *in trans*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(4), pp. 1648-52.
- Ford, P. C. (2010) 'Reactions of NO and nitrite with heme models and proteins', *Inorg Chem*, 49(14), pp. 6226-39.
- Forte, E., Urbani, A., Saraste, M., Sarti, P., Brunori, M. and Giuffrè, A. (2001) 'The cytochrome cbb3 from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity', *Eur J Biochem*, 268(24), pp. 6486-91.
- Freschi, L. (2013) 'Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives', *Front Plant Sci*, 4, pp. 398.
- Galetskiy, D., Lohscheider, J. N., Kononikhin, A. S., Popov, I. A., Nikolaev, E. N. and Adamska, I. (2011) 'Phosphorylation and nitration levels of photosynthetic proteins are conversely regulated by light stress', *Plant Mol Biol*, 77(4-5), pp. 461-73.
- García-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L. and Blatt, M. R. (2003) 'Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), pp. 11116-21.
- Gaupels, F., Spiazzi-Vandelle, E., Yang, D. and Delledonne, M. (2011) 'Detection of peroxynitrite accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive defense response', *Nitric Oxide*, 25(2), pp. 222-8.

- Gayatri, G., Agurla, S. and Raghavendra, A. S. (2013) 'Nitric oxide in guard cells as an important secondary messenger during stomatal closure', *Front Plant Sci*, 4, pp. 425.
- Gilles-Gonzalez, M. A., Gonzalez, G., Sousa, E. H. and Tuckerman, J. (2008) 'Oxygen-sensing histidine-protein kinases: assays of ligand binding and turnover of response-regulator substrates', *Methods Enzymol*, 437, pp. 173-89.
- Giuffrè, A., Stubauer, G., Sarti, P., Brunori, M., Zumft, W. G., Buse, G. and Soulimane, T. (1999) 'The heme-copper oxidases of *Thermus thermophilus* catalyze the reduction of nitric oxide: evolutionary implications', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), pp. 14718-23.
- Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S. and Durner, J. (2006) 'Nitric oxide and gene regulation in plants', *J Exp Bot*, 57(3), pp. 507-16.
- Guo, F. Q., Okamoto, M. and Crawford, N. M. (2003) 'Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling', *Science*, 302(5642), pp. 100-3.
- Gupta, K. J., Hebelstrup, K. H., Mur, L. A. and Igamberdiev, A. U. (2011) 'Plant hemoglobins: important players at the crossroads between oxygen and nitric oxide', *FEBS Lett*, 585(24), pp. 3843-9.
- Gómez-Hernández, N., Reyes-González, A., Sánchez, C., Mora, Y., Delgado, M. J. and Girard, L. (2011) 'Regulation and symbiotic role of nirK and norC expression in *Rhizobium etli*', *Mol Plant Microbe Interact*, 24(2), pp. 233-45.
- He, Y., Tang, R. H., Hao, Y., Stevens, R. D., Cook, C. W., Ahn, S. M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R. B., Crawford, N. M. and Pei, Z. M. (2004) 'Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition', *Science*, 305(5692), pp. 1968-71.
- Herold, S. and Puppo, A. (2005) 'Oxyleghemoglobin scavenges nitrogen monoxide and peroxynitrite: a possible role in functioning nodules?', *J Biol Inorg Chem*, 10(8), pp. 935-45.
- Herrera, M. and Garvin, J. L. (2011) 'Aquaporins as gas channels', *Pflügers Arch*, 462(4), pp. 623-30.
- Hino, T., Matsumoto, Y., Nagano, S., Sugimoto, H., Fukumori, Y., Murata, T., Iwata, S. and Shiro, Y. (2010) 'Structural basis of biological N₂O generation by bacterial nitric oxide reductase', *Science*, 330(6011), pp. 1666-70.
- Horchani, F., Prévot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., Raymond, P., Boncompagni, E., Aschi-Smiti, S., Puppo, A. and Brouquisse, R. (2011) 'Both plant and bacterial nitrate reductases contribute to nitric oxide production in *Medicago truncatula* nitrogen-fixing nodules', *Plant Physiol*, 155(2), pp. 1023-36.
- House, B. I. (2003) Novel methods of manipulating the *Sinorhizobium meliloti* genome and studying the effects of denitrification on symbiotic nitrogen fixation. School of Molecular Biosciences: WASHINGTON STATE UNIVERSITY
- Igamberdiev, A. U. and Hill, R. D. (2004) 'Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways', *J Exp Bot*, 55(408), pp. 2473-82.
- Jamet, A., Euphrasie, D., Martin, P. and Nassif, X. (2013) 'Identification of genes involved in *Neisseria meningitidis* colonization', *Infect Immun*, 81(9), pp. 3375-81.
- Jetten, M. S. (2008) 'The microbial nitrogen cycle', *Environ Microbiol*, 10(11), pp. 2903-9.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. and Walker, G. C. (2007) 'How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model', *Nat Rev Microbiol*, 5(8), pp. 619-33.
- Jovanović, A. M., Durst, S. and Nick, P. (2010) 'Plant cell division is specifically affected by nitrotyrosine', *J Exp Bot*, 61(3), pp. 901-9.
- Justino, M. C., Almeida, C. C., Teixeira, M. and Saraiva, L. M. (2007) '*Escherichia coli* di-iron YtfE protein is necessary for the repair of stress-damaged iron-sulfur clusters', *J Biol Chem*, 282(14), pp. 10352-9.
- Justino, M. C., Vicente, J. B., Teixeira, M. and Saraiva, L. M. (2005) 'New genes implicated in the protection of anaerobically grown *Escherichia coli* against nitric oxide', *J Biol Chem*, 280(4), pp. 2636-43.
- Kato, K., Kanahama, K. and Kanayama, Y. (2010) 'Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules', *J Plant Physiol*, 167(3), pp. 238-41.
- Keyster, M., Klein, A. and Ludidi, N. (2010) 'Endogenous NO levels regulate nodule functioning: potential role of cGMP in nodule functioning?', *Plant Signal Behav*, 5(12), pp. 1679-81.

- Kimura, M., Ishii, M., Igarashi, Y. and Arai, H. (2012) 'Identification of the genes encoding nitric oxide reductase in the aerobic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans* OCh114', *Biosci Biotechnol Biochem*, 76(10), pp. 1984-6.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Urano, Y., Higuchi, T., Tanaka, J., Kudo, Y. and Nagano, T. (1998) 'Direct evidence of NO production in rat hippocampus and cortex using a new fluorescent indicator: DAF-2 DA', *Neuroreport*, 9(15), pp. 3345-8.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A. and Wendehenne, D. (2004) 'Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein', *Plant Physiol*, 135(1), pp. 516-29.
- Lindermayr, C., Sell, S., Müller, B., Leister, D. and Durner, J. (2010) 'Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide', *Plant Cell*, 22(8), pp. 2894-907.
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R. and León, J. (2011) 'In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*', *J Exp Bot*, 62(10), pp. 3501-17.
- Lullien, V., Barker, D. G., de Lajudie, P. and Huguet, T. (1987) 'Plant gene expression in effective and ineffective root nodules of alfalfa (*Medicago sativa*)', *Plant Mol Biol*, 9(5), pp. 469-78.
- Maiti, D., Sarkar, T. S. and Ghosh, S. (2012) 'Detection of S-nitrosothiol and nitrosylated proteins in *Arachis hypogaea* functional nodule: response of the nitrogen fixing symbiont', *PLoS One*, 7(9), pp. e45526.
- Maskall, C. S., J. F. Gibson & P. J. Dart, (1977) Electron-paramagnetic-resonance studies of leghaemoglobins from soya-bean and cowpea root nodules. Identification of nitrosyl-leghaemoglobin in crude leghaemoglobin preparations. *Biochem J* **167**: 435-445
- Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., Poole, R. K. and Cooper, C. E. (2009) 'Cytochrome bd confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*', *Nat Chem Biol*, 5(2), pp. 94-6.
- Mathieu, C., Moreau, S., Frendo, P., Puppo, A. and Davies, M. J. (1998) 'Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes', *Free Radic Biol Med*, 24(7-8), pp. 1242-9.
- McAinsh, M. R. and Pittman, J. K. (2009) 'Shaping the calcium signature', *New Phytol*, 181(2), pp. 275-94.
- Meakin, G. E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E. J., Richardson, D. J. and Delgado, M. J. (2007) 'The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules', *Microbiology*, 153(Pt 2), pp. 411-9.
- Meilhoc, E., Boscari, A., Bruand, C., Puppo, A. and Brouquisse, R. (2011) 'Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis', *Plant Sci*, 181(5), pp. 573-81.
- Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A. and Bruand, C. (2010) 'The response to nitric oxide of the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium meliloti*', *Mol Plant Microbe Interact*, 23(6), pp. 748-59.
- Melo, P. M., Silva, L. S., Ribeiro, I., Seabra, A. R. and Carvalho, H. G. (2011) 'Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration', *Plant Physiol*, 157(3), pp. 1505-17.
- Miller, J., (1972) Experiments in Molecular Genetics. NY: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. p. 352-355
- Mulaudzi, T., Ludidi, N., Ruzvidzo, O., Morse, M., Hendricks, N., Iwuoha, E. and Gehring, C. (2011) 'Identification of a novel *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity *in vitro*', *FEBS Lett*, 585(17), pp. 2693-7.
- Mur, L. A., Santosa, I. E., Laarhoven, L. J., Holton, N. J., Harren, F. J. and Smith, A. R. (2005) 'Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* Pathovars', *Plant Physiol*, 138(3), pp. 1247-58.
- Nagata, M., Murakami, E., Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S. and Uchiumi, T. (2008) 'Expression of a class 1 hemoglobin gene and production of nitric oxide in response to symbiotic and pathogenic bacteria in *Lotus japonicus*', *Mol Plant Microbe Interact*, 21(9), pp. 1175-83.

- Navascués, J., Pérez-Rontomé, C., Gay, M., Marcos, M., Yang, F., Walker, F. A., Desbois, A., Abián, J. and Becana, M. (2012) 'Leghemoglobin green derivatives with nitrated hemes evidence production of highly reactive nitrogen species during aging of legume nodules', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(7), pp. 2660-5.
- Niemann, J. and Tisa, L. S. (2008) 'Nitric oxide and oxygen regulate truncated hemoglobin gene expression in *Frankia* strain CcI3', *J Bacteriol*, 190(23), pp. 7864-7.
- Ott, T., van Dongen, J. T., Günther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P. and Udvardi, M. K. (2005) 'Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development', *Curr Biol*, 15(6), pp. 531-5.
- Overton, T. W., Justino, M. C., Li, Y., Baptista, J. M., Melo, A. M., Cole, J. A. and Saraiva, L. M. (2008) 'Widespread distribution in pathogenic bacteria of di-iron proteins that repair oxidative and nitrosative damage to iron-sulfur centers', *J Bacteriol*, 190(6), pp. 2004-13.
- Parihar, A., Vaccaro, P. and Ghafourifar, P. (2008) 'Nitric oxide irreversibly inhibits cytochrome oxidase at low oxygen concentrations: evidence for inverse oxygen concentration-dependent peroxynitrite formation', *IUBMB Life*, 60(1), pp. 64-7.
- Paul, V. and Ekambara, P. (2011) 'Involvement of nitric oxide in learning & memory processes', *Indian J Med Res*, 133, pp. 471-8.
- Pauly, N., Ferrari, C., Andrio, E., Marino, D., Piardi, S., Brouquisse, R., Baudouin, E. and Puppo, A. (2011) 'MtNOA1/RIF1 modulates *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* nodule development without affecting its nitric oxide content', *J Exp Bot*, 62(3), pp. 939-48.
- Pei, J., Li, W., Kinch, L. N. and Grishin, N. V. (2014) 'Conserved evolutionary units in the heme-copper oxidase superfamily revealed by novel homologous protein families', *Protein Sci*, 23(9), pp. 1220-34.
- Pierre, O., Hopkins, J., Combier, M., Baldacci, F., Engler, G., Brouquisse, R., Hérouart, D. and Boncompagni, E. (2014) 'Involvement of papain and legumain proteinase in the senescence process of *Medicago truncatula* nodules', *New Phytol*, 202(3), pp. 849-63.
- Pii, Y., Crimi, M., Cremonese, G., Spena, A. and Pandolfini, T. (2007) 'Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation', *BMC Plant Biol*, 7, pp. 21.
- Plate, L. and Marletta, M. A. (2013) 'Nitric oxide-sensing H-NOX proteins govern bacterial communal behavior', *Trends Biochem Sci*, 38(11), pp. 566-75.
- Pobigaylo, N., Wetter, D., Szymczak, S., Schiller, U., Kurtz, S., Meyer, F., Nattkemper, T. W. and Becker, A. (2006) 'Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*', *Appl Environ Microbiol*, 72(6), pp. 4329-37.
- Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M. M., de Felipe, M. R., Harrison, J., Vanacker, H. and Foyer, C. H. (2005) 'Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process', *New Phytol*, 165(3), pp. 683-701.
- Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K. and Brouquisse, R. (2013) 'Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses', *Antioxid Redox Signal*, 18(16), pp. 2202-19.
- Pérez Guerra, J. C., Coussens, G., De Keyser, A., De Rycke, R., De Bodt, S., Van De Velde, W., Goormachtig, S. and Holsters, M. (2010) 'Comparison of developmental and stress-induced nodule senescence in *Medicago truncatula*', *Plant Physiol*, 152(3), pp. 1574-84.
- Qiao, W. and Fan, L. M. (2008) 'Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses', *J Integr Plant Biol*, 50(10), pp. 1238-46.
- Rodionov, D. A., Dubchak, I. L., Arkin, A. P., Alm, E. J. and Gelfand, M. S. (2005) 'Dissimilatory metabolism of nitrogen oxides in bacteria: comparative reconstruction of transcriptional networks', *PLoS Comput Biol*, 1(5), pp. e55.
- Romero-Puertas, M. C., Perazzolli, M., Zago, E. D. and Delledonne, M. (2004) 'Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions', *Cell Microbiol*, 6(9), pp. 795-803.
- Roux, B., Rodde, N., Jardinaud, M. F., Timmers, T., Sauviac, L., Cottret, L., Carrère, S., Sallet, E., Courcelle, E., Moreau, S., Debelle, F., Capela, D., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Bruand, C. and Gamas, P. (2014) 'An integrated analysis of plant and bacterial gene expression in

- symbiotic root nodules using laser-capture microdissection coupled to RNA sequencing', *Plant J*, 77(6), pp. 817-37.
- Rubbo, H., Trostchansky, A. and O'Donnell, V. B. (2009) 'Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences', *Arch Biochem Biophys*, 484(2), pp. 167-72.
- Sainz, M., Calvo-Begueria, L., Pérez-Rontomé, C., Wienkoop, S., Abián, J., Staudinger, C., Bartesaghi, S., Radi, R. and Becana, M. (2015) 'Leghemoglobin is nitrated in functional legume nodules in a tyrosine residue within the heme cavity by a nitrite/peroxide-dependent mechanism', *Plant J*, 81(5), pp. 723-35.
- Sasakura, F., Uchiumi, T., Shimoda, Y., Suzuki, A., Takenouchi, K., Higashi, S. and Abe, M. (2006) 'A class 1 hemoglobin gene from *Alnus firma* functions in symbiotic and nonsymbiotic tissues to detoxify nitric oxide', *Mol Plant Microbe Interact*, 19(4), pp. 441-50.
- Sauviac, L., Philippe, H., Phok, K. and Bruand, C. (2007) 'An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*', *J Bacteriol*, 189(11), pp. 4204-16.
- Scheler, C., Durner, J. and Astier, J. (2013) 'Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions', *Curr Opin Plant Biol*, 16(4), pp. 534-9.
- Seabra, A. R., Pereira, P. A., Becker, J. D. and Carvalho, H. G. (2012) 'Inhibition of glutamine synthetase by phosphinothricin leads to transcriptome reprogramming in root nodules of *Medicago truncatula*', *Mol Plant Microbe Interact*, 25(7), pp. 976-92.
- Serrano, I., Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, L. M. and Olmedilla, A. (2012) 'Peroxynitrite mediates programmed cell death both in papillar cells and in self-incompatible pollen in the olive (*Olea europaea* L.)', *J Exp Bot*, 63(3), pp. 1479-93.
- Serrano, I., Romero-Puertas, M. C., Sandalio, L. M. and Olmedilla, A. (2015) 'The role of reactive oxygen species and nitric oxide in programmed cell death associated with self-incompatibility', *J Exp Bot*, 66(10), pp. 2869-76.
- Seth, D., Hausladen, A., Wang, Y. J. and Stamler, J. S. (2012) 'Endogenous protein S-Nitrosylation in *E. coli*: regulation by OxyR', *Science*, 336(6080), pp. 470-3.
- Shimoda, Y., Shimoda-Sasakura, F., Kucho, K., Kanamori, N., Nagata, M., Suzuki, A., Abe, M., Higashi, S. and Uchiumi, T. (2009) 'Overexpression of class 1 plant hemoglobin genes enhances symbiotic nitrogen fixation activity between *Mesorhizobium loti* and *Lotus japonicus*', *Plant J*, 57(2), pp. 254-63.
- Shiro, Y. (2012) 'Structure and function of bacterial nitric oxide reductases: nitric oxide reductase, anaerobic enzymes', *Biochim Biophys Acta*, 1817(10), pp. 1907-13.
- Silva, L. and Carvalho, H. (2013) 'Possible role of glutamine synthetase in the NO signaling response in root nodules by contributing to the antioxidant defenses', *Front Plant Sci*, 4, pp. 372.
- Simpson, G. G. (2005) 'NO flowering', *Bioessays*, 27(3), pp. 239-41.
- Song, F. and Goodman, R. M. (2001) 'Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance', *Mol Plant Microbe Interact*, 14(12), pp. 1458-62.
- Sousa, F. L., Alves, R. J., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M. and Pereira, M. M. (2011) 'A bioinformatics classifier and database for heme-copper oxygen reductases', *PLoS One*, 6(4), pp. e19117.
- Spiro, S. (2007) 'Regulators of bacterial responses to nitric oxide', *FEMS Microbiol Rev*, 31(2), pp. 193-211.
- Stamler, J. S., Singel, D. J. and Loscalzo, J. (1992) 'Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms', *Science*, 258(5090), pp. 1898-902.
- Stern, A. M., Hay, A. J., Liu, Z., Desland, F. A., Zhang, J., Zhong, Z. and Zhu, J. (2012) 'The NorR regulon is critical for *Vibrio cholerae* resistance to nitric oxide and sustained colonization of the intestines', *MBio*, 3(2), pp. e00013-12.
- Stern, A. M., Liu, B., Bakken, L. R., Shapleigh, J. P. and Zhu, J. (2013) 'A novel protein protects bacterial iron-dependent metabolism from nitric oxide', *J Bacteriol*, 195(20), pp. 4702-8.
- Stern, A. M. and Zhu, J. (2014) 'An introduction to nitric oxide sensing and response in bacteria', *Adv Appl Microbiol*, 87, pp. 187-220.
- Storz, G., Tartaglia, L. A. and Ames, B. N. (1990) 'The OxyR regulon', *Antonie Van Leeuwenhoek*, 58(3), pp. 157-61.

- Sánchez, C., Cabrera, J. J., Gates, A. J., Bedmar, E. J., Richardson, D. J. and Delgado, M. J. (2011) 'Nitric oxide detoxification in the rhizobia-legume symbiosis', *Biochem Soc Trans*, 39(1), pp. 184-8.
- Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., Bedmar, E. J. and Delgado, M. J. (2010) 'Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin complexes in soybean nodules in response to flooding', *Mol Plant Microbe Interact*, 23(5), pp. 702-11.
- Terrile, M. C., París, R., Calderón-Villalobos, L. I., Iglesias, M. J., Lamattina, L., Estelle, M. and Casalongué, C. A. (2012) 'Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the *Arabidopsis* TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor', *Plant J*, 70(3), pp. 492-500.
- Timmers, A. C., Soupène, E., Auriac, M. C., de Billy, F., Vasse, J., Boistard, P. and Truchet, G. (2000) 'Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules', *Mol Plant Microbe Interact*, 13(11), pp. 1204-13.
- Tosques, I. E., Shi, J. and Shapleigh, J. P. (1996) 'Cloning and characterization of *nnrR*, whose product is required for the expression of proteins involved in nitric oxide metabolism in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.3', *J Bacteriol*, 178(16), pp. 4958-64.
- Trinchant, J. C. and Rigaud, J. (1982) 'Nitrite and nitric oxide as inhibitors of nitrogenase from soybean bacteroids', *Appl Environ Microbiol*, 44(6), pp. 1385-8.
- Tripathi, P., Kashyap, L. and Singh, V. (2007) 'The role of nitric oxide in inflammatory reactions', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 51(3), pp. 443-52.
- Tun, N. N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E. I. and Scherer, G. F. (2006) 'Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings', *Plant Cell Physiol*, 47(3), pp. 346-54.
- Van de Velde, W., Guerra, J. C., De Keyser, A., De Rycke, R., Rombauts, S., Maunoury, N., Mergaert, P., Kondorosi, E., Holsters, M. and Goormachtig, S. (2006) 'Aging in legume symbiosis. A molecular view on nodule senescence in *Medicago truncatula*', *Plant Physiol*, 141(2), pp. 711-20.
- Vincent, J. M., (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: *IBP handbook*. Blackwells, Oxford.
- Vieweg, M. F., Hohnjec, N. and Küster, H. (2005) 'Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*', *Planta*, 220(5), pp. 757-66.
- Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Visconti, K. C., Harrell, M. I., Dolganov, G. M., Sherman, D. R. and Schoolnik, G. K. (2003) 'Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program', *J Exp Med*, 198(5), pp. 705-13.
- Wang, Y., Loake, G. J. and Chu, C. (2013) 'Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death', *Front Plant Sci*, 4, pp. 314.
- Wang, Y. and Ruby, E. G. (2011) 'The roles of NO in microbial symbioses', *Cell Microbiol*, 13(4), pp. 518-26.
- Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W. and Allen, J. S. (1991) 'DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors', *Science*, 254(5034), pp. 1001-3.
- Xu, Y., Wen, X., Wen, L. S., Wu, L. Y., Deng, N. Y. and Chou, K. C. (2014) 'iNitro-Tyr: prediction of nitrotyrosine sites in proteins with general pseudo amino acid composition', *PLoS One*, 9(8), pp. e105018.
- Xue, Y., Liu, Z., Gao, X., Jin, C., Wen, L., Yao, X. and Ren, J. (2010) 'GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm', *PLoS One*, 5(6), pp. e11290.
- Yamasaki, H. and Sakihama, Y. (2000) 'Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species', *FEBS Lett*, 468(1), pp. 89-92.
- Yang, J. and Zhang, Y. (2015) 'I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions', *Nucleic Acids Res*, 43(W1), pp. W174-81.
- Young, N. D. and Debellé, F. and Oldroyd, G. E. and Geurts, R. and Cannon, S. B. and Udvardi, M. K. and Benedito, V. A. and Mayer, K. F. and Gouzy, J. and Schoof, H. and Van de Peer, Y.

- and Proost, S. and Cook, D. R. and Meyers, B. C. and Spannagl, M. and Cheung, F. and De Mita, S. and Krishnakumar, V. and Gundlach, H. and Zhou, S. and Mudge, J. and Bharti, A. K. and Murray, J. D. and Naoumkina, M. A. and Rosen, B. and Silverstein, K. A. and Tang, H. and Rombauts, S. and Zhao, P. X. and Zhou, P. and Barbe, V. and Bardou, P. and Bechner, M. and Bellec, A. and Berger, A. and Bergès, H. and Bidwell, S. and Bisseling, T. and Choisine, N. and Couloux, A. and Denny, R. and Deshpande, S. and Dai, X. and Doyle, J. J. and Dudez, A. M. and Farmer, A. D. and Fouteau, S. and Franken, C. and Gibelin, C. and Gish, J. and Goldstein, S. and González, A. J. and Green, P. J. and Hallab, A. and Hartog, M. and Hua, A. and Humphray, S. J. and Jeong, D. H. and Jing, Y. and Jöcker, A. and Kenton, S. M. and Kim, D. J. and Klee, K. and Lai, H. and Lang, C. and Lin, S. and Macmil, S. L. and Magdelenat, G. and Matthews, L. and McCorrison, J. and Monaghan, E. L. and Mun, J. H. and Najar, F. Z. and Nicholson, C. and Noiro, C. and O'Bleness, M. and Paule, C. R. and Poulain, J. and Prion, F. and Qin, B. and Qu, C. and Retzel, E. F. and Riddle, C. and Sallet, E. and Samain, S. and Samson, N. and Sanders, I. and Saurat, O. and Scarpelli, C. and Schiex, T. and Segurens, B. and Severin, A. J. and Sherrier, D. J. and Shi, R. and Sims, S. and Singer, S. R. and Sinharoy, S. and Sterck, L. and Viollet, A. and Wang, B. B. and Wang, K. and Wang, M. and Wang, X. and Warfsmann, J. and Weissenbach, J. and White, D. D. and White, J. D. and Wiley, G. B. and Wincker, P. and Xing, Y. and Yang, L. and Yao, Z. and Ying, F. and Zhai, J. and Zhou, L. and Zuber, A. and Dénarié, J. and Dixon, R. A. and May, G. D. and Schwartz, D. C. and Rogers, J. and Quétier, F. and Town, C. D. and Roe, B. A. (2011) 'The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses', *Nature*, 480(7378), pp. 520-4.
- Yu, M., Lamattina, L., Spoel, S. H. and Loake, G. J. (2014) 'Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution', *New Phytol*, 202(4), pp. 1142-56.
- Yun, B. W., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N. B., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J. W., Kang, J. G., Kwon, E., Spoel, S. H., Pallas, J. A. and Loake, G. J. (2011) 'S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity', *Nature*, 478(7368), pp. 264-8.
- Zhang, C., Czymbek, K. J. and Shapiro, A. D. (2003) 'Nitric oxide does not trigger early programmed cell death events but may contribute to cell-to-cell signaling governing progression of the *Arabidopsis* hypersensitive response', *Mol Plant Microbe Interact*, 16(11), pp. 962-72.
- Zumft, W. G. (2002) 'Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family', *J Mol Microbiol Biotechnol*, 4(3), pp. 277-86.

RESUME

Auteur : Pauline Blanquet

Titre : Etude de protéines de *Sinorhizobium meliloti* impliquées dans le contrôle du niveau de NO : modulation de la sénescence des nodules de *Medicago truncatula*.

Directeurs de thèse : Claude Bruand et Eliane Meilhoc

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule gazeuse impliquée dans de nombreux processus biologiques chez les plantes, de la germination de la graine à la mise en place de réponses à des stress abiotiques et biotiques. Dans les interactions plante/ pathogène, le NO fait partie de l'arsenal de défenses de l'hôte. En réponse, les pathogènes ont développé des mécanismes pour contrer les effets du NO. Dans la symbiose fixatrice d'azote entre la légumineuse modèle *Medicago truncatula* et la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, du NO a été détecté durant toutes les phases de l'interaction. L'équipe avait précédemment montré que la réponse de *S. meliloti* au NO est nécessaire au maintien de la symbiose puisque des nodules formés par une souche mutée dans le gène *hmp* (le gène *hmp* est induit par le NO et code pour une protéine qui dégrade le NO) sénescent prématurément. Au cours de cette thèse, nous avons étudié 3 nouveaux gènes de *S. meliloti* induits par le NO : *nnrS1*, *nnrS2* et *norB*. *nnrS1* et *nnrS2* codent pour deux protéines de fonction inconnue et *norB* code pour une NO réductase qui dégrade le NO. Nous avons montré que ces 3 protéines participent d'une part à la résistance des bactéries au NO en culture et d'autre part, au maintien de l'interaction symbiotique. Par ailleurs, nous avons montré que ces 3 protéines sont impliquées directement ou indirectement dans la dégradation du NO et des résultats préliminaires suggèrent que NnrS1 présente une activité NO réductase. De plus, nous avons montré que NnrS1 et Hmp n'agissent pas seulement sur les bactéries mais aussi sur les protéines végétales. Il était connu que dans les nodules de *M. truncatula*, la glutamine synthétase (GS) végétale, une enzyme clé de la symbiose, est inhibée par tyrosine nitration, une modification post-traductionnelle dépendante du NO. Nous avons montré que NnrS1 et Hmp, en modulant le niveau de NO dans les nodules, contrôlent l'activité de la GS. Enfin des expériences préliminaires montrent que d'autres protéines (bactériennes et/ou végétales) pourraient être tyrosine nitrées.

Intitulé et adresse du laboratoire : Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, CNRS/INRA 2594/441, Chemin de Borderouge, BP52627, 31326 Castanet-Tolosan Cedex.